

Untersuchungen basaler Transkriptionsfaktoren im Infektionsverlauf großer DNA-Viren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Ilja Quadt

aus Köln

September 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln angefertigt.



Referentin: Professor Dr. D. Knebel-Mörsdorf
Max-Planck-Institut für neurologische Forschung
und Klinik für Neurologie, Universität zu Köln

Koreferent: Professor Dr. J. Brüning
Institut für Genetik, Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Viren – und die Bedeutung der Erforschung ihrer Wirtszell-Interaktionen	1
2.	Das <i>Autographa californica</i> Kernpolyedervirus (AcMNPV) ist ein Mitglied der Virus-Familie Baculoviridae	2
2.1.	Verwendungsgebiete von Baculoviren	3
2.2.	Der baculovirale Infektionszyklus	4
2.3.	Baculovirale Genexpression	7
3.	<i>Herpes simplex</i> Virus Typ 1 (HSV-1), ein Mitglied der Familie der Herpesviridae	12
3.1.	Genexpressionskaskade und <i>in vitro</i> -Infektion von HSV-1	12
4.	TBP als basaler Transkriptionsfaktor in eukaryotischen Transkriptionskomplexen	14
4.1.	Die Bedeutung von TBP für die Genexpression	16
4.2.	Funktionen der TAFs im Transkriptionsfaktor TFIID	20
5.	Zielsetzung der Arbeit	24
II.	Material	25
1.	Chemikalien	25
2.	Puffer, Lösungen und Medien	26
3.	Enzyme	29
4.	Plasmide, cDNAs und Primer	29
4.1.	Plasmide und cDNAs	29
4.2.	Primer	29
5.	Zelllinien, Bakterienstämme und Viren	31
5.1.	Zelllinien	31
5.2.	Bakterienstämme	31
5.3.	Viren	31
5.3.1.	AcMNPV	31
5.3.2.	HSV-1	31
6.	Antiseren, Antikörper und Proteinstandards	32
6.1.	Primäre Antikörper	32
6.1.1.	Primäre Antikörper gegen virale Proteine	32
6.1.2.	Primäre Antikörper gegen zelluläre Proteine	33
6.2.	Sekundäre Antikörper	35

6.3.	Fluorochrom-gekoppeltes Phalloidin	36
6.4.	Proteinstandard	36
7.	Computer und Software	36
8.	Geräte und sonstiges Material	36
III.	Methoden	38
1.	Zellkulturen	38
1.1.	Kultivierung der Zelllinie TN-368	38
1.2.	Kultivierung der Zelllinie IPLB-Sf21	38
1.3.	Einfrieren und Auftauen von Insektenzellen	38
1.4.	Kultivierung von HFFF2-Zellen	39
1.5.	Einfrieren und Auftauen von HFFF2-Zellen	39
1.6.	Bestimmung der Zellzahl	39
1.7.	Mykoplasmentest der Zellkulturen	40
2.	Arbeiten mit Viren	40
2.1.	AcMNPV-Vermehrung	40
2.2.	Bestimmung der Infektiosität eines AcMNPV-Inokulums („Plaque-Test“)	40
2.3.	Infektion von Insektenzellen mit AcMNPV	41
2.4.	Vermehrung von HSV-1 CAV („cell-associated virus“) und Bestimmung der Infektiosität	41
2.5.	Infektion von Säugerzellen mit HSV-1	42
3.	Arbeiten mit zellulären Inhibitoren	42
3.1.	Behandlung von Insektenzellen mit Cycloheximid (CHX)	42
3.2.	Inkubation von Insektenzellen mit Aphidicolin	43
3.3.	Behandlung von HFFF2-Zellen mit PAA („Phosphonoacetic acid“)	43
4.	Arbeiten mit DNA	45
4.1.	Ethanol-fällung von DNA	45
4.2.	Phenol/Chloroform-Extraktion	45
4.3.	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	45
4.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation kleiner DNA-Fragmente	45
4.5.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
4.6.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	46
4.7.	Herstellung kompetenter Bakterien	46
4.8.	Hitzeschocktransformation von DNA in kompetente Bakterien	46

4.9.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien („Maxi-Präparation“, Qiagen)	46
4.10.	Sequenzierung von Plasmid-DNA	46
5.	Arbeiten mit RNA	46
5.1.	Präparation von Gesamt-RNA aus Sf21-Zellen	46
5.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Fragmenten	47
5.3.	Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter („Northern Blotting“)	47
6.	RNA-Interferenzanalysen (RNAi)	48
6.1.	Mechanismus und Verwendung der RNA-Interferenz	48
6.2.	Herstellung spezifischer dsRNAs	49
7.	Transfektion von Sf21-Zellen mit Plasmid-DNA oder dsRNAs	50
8.	Arbeiten mit Proteinen	51
8.1.	Präparation von fraktionierten, detergenzbehandelten Proteinextrakten aus Zellkulturen (Detergenzmethode)	51
8.2.	Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Zellkulturen	52
8.3.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Test)	52
8.4.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	54
8.5.	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen mit anschließendem immunchemischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper („Western Blotting“)	55
8.6.	Zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen (2-D-Gelanalysen) mit anschließender Western Blot- oder MALDI-TOF-Analyse	56
9.	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung und -mikroskopie	57
9.1.	Zellpräparation	57
9.2.	Fixierung der Zellen durch Vernetzung (Paraformaldehyd-Fixierung)	58
9.3.	Markierung der Zellen mit BrdU und Denaturierung der DNA in BrdU- markierten Zellen	58
9.4.	Antikörperbindung	58
9.5.	Doppelfärbungen	59
9.6.	Fluoreszenzmikroskopie	60
9.6.1.	Epi-Fluoreszenzmikroskopie	60
9.6.2.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	60

IV.	Ergebnisse	61
1.	Untersuchungen zur Expression und Lokalisierung von TBP im baculoviralen Infektionsverlauf	61
1.1.	Expression von TBP im baculoviralen Infektionsverlauf	61
1.1.1.	TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	61
1.1.2.	TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	63
1.1.3.	Quantifizierung der TBP-Proteinmengen in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	65
1.1.4.	Spezifitätsanalysen der anti-SfTBP-Antiseren	66
1.2.	Lokalisierungsstudien über TBP	68
1.2.1.	Kolokalisierung von TBP mit viralen Replikationszentren	68
1.2.2.	Abhängigkeit der TBP-Relokalisierung von der baculoviralen DNA-Replikation	70
1.2.3.	Lokalisierung der zellulären RNAP II und Expression von LEF-4 als Komponente der viruskodierten RNA-Polymerase in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	72
1.2.3.1.	RNAP II-Lokalisierung während der Baculovirusinfektion	72
1.2.3.2.	LEF-4-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	74
1.3.	Zusammenfassung der Studien über TBP und die RNA-Polymerasen	75
2.	Studien zur Stabilität von TBP und zum Einfluss der Translationshemmung auf die TBP-Lokalisierung	76
2.1.	TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen nach Hemmung der Translation	76
2.2.	Expression von TBP in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen nach Inhibition der Translation	77
2.3.	Einfluss der Translationshemmung auf die TBP-Lokalisierung in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	80
3.	Kolokalisierungsstudien von TBP, IE2 und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	83
3.1.	Kolokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	83
3.2.	Kolokalisierungsstudien von TBP und konjugiertem Ubiquitin im AcMNPV-Infektionsverlauf	85
3.3.	Kolokalisierung von TBP und IE2 in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	87

3.4.	Analysen des Einflusses viralen Ubiquitins auf die Lokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin im AcMNPV-Infektionsverlauf	89
4.	RNA-Interferenzstudien über TBP, IE2, DBP und LEF-4 während der Baculovirusinfektion	92
4.1.	Etablierung der RNA-Interferenztechnik	93
4.1.1.	Funktionsnachweis der RNAi-Methode in Sf21-Zellen	93
4.1.2.	Etablierung der optimalen Bedingungen für die RNAi-Methode	95
4.2.	Funktionelle Untersuchungen zu IE2 durch RNAi während der Baculovirusinfektion	98
4.3.	Funktionsanalyse von AcMNPV DBP durch RNA-Interferenzstudien	101
4.3.1.	Optimierung der Bedingungen für RNAi-Studien über AcMNPV DBP	101
4.3.2.	Funktionelle Studien über DBP durch RNAi während der AcMNPV-Infektion	103
4.4.	Analysen der LEF-4-Funktionen durch RNA-Interferenzstudien im AcMNPV-Infektionsverlauf	108
4.4.1.	Expressionsstudien und RNAi-Etablierung für LEF-4 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	108
4.4.2.	Funktionelle LEF-4-Untersuchungen durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf	110
4.4.3.	Einfluss der LEF-4-Inhibition auf die Baculovirusproduktion	113
4.5.	TBP-RNA-Interferenzstudien in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	115
5.	Expressionsstudien über TAFs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	120
5.1.	Expressionsanalysen von TAF9 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	120
5.2.	Expressionsanalysen von TAF5 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	122
5.3.	Lokalisierungsstudien von TAF5 im baculoviralen Infektionsverlauf	124
6.	Lokalisierungs- und Expressionsstudien über TBP und TAFs im HSV-1-Infektionsverlauf	126
6.1.	Expressionsanalysen basaler Transkriptionsfaktoren und Lokalisierungsstudien über TBP in HSV-1-infizierten primären Fibroblasten	126
6.2.	Kolokalisierung von HSV-1 ICP4 mit viralen Replikationszentren	128
6.3.	Kolokalisierung von RNAP II mit ICP4 in HSV-1-infizierten HFFF2-Zellen	130
6.4.	Kolokalisierungsstudien über TBP im HSV-1-Infektionsverlauf	131
6.4.1.	Titrierungsstudien des Virus-DNA-Replikationsinhibitors PAA	131

6.4.2.	Kolokalisierung von TBP und ICP4 in HSV-1-infizierten primären Fibroblasten	132
6.5.	Kolokalisierung von hsTAF1 mit ICP4 in HSV-1-infizierten HFFF-2-Zellen	134
6.6.	Kolokalisierungsstudien über hsTAF4 im HSV-1-Infektionsverlauf	135
V.	Diskussion und Ausblick	138
1.	Die TBP-Proteinmenge steigt im AcMNPV-Infektionszyklus an	138
2.	TBP lokalisiert im baculoviralen Infektionsverlauf in viralen Replikationszentren	141
3.	Protein-Ubiquitinierungen während der Baculovirusinfektion	143
4.	Inhibitionsstudien über TBP und die AcMNPV-Faktoren IE2, DBP und LEF-4	146
5.	Welchen Einfluss haben AcMNPV- und HSV-1-Infektionen auf die Expression von TAFs?	152
6.	Subzelluläre Relokalisierungen von TFIID-Komponenten: Ein konservierter Mechanismus im Infektionsverlauf großer DNA-Viren	156
7.	Ausblick	158
7.1.	Analysen des Mechanismus und der Bedeutung des TBP-Proteinanstiegs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	158
7.2.	RNAi-Studien über den Mechanismus der DBP-Wirkung auf LEFs	159
VI.	Zusammenfassung	161
VII.	Literaturverzeichnis	164
VIII.	Kurzzusammenfassung	185
IX.	Abstract	187
X.	Erklärung	189
XI.	Lebenslauf	190
XII.	Danksagung	191

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Graphische Darstellung des Infektionszyklus von AcMNPV	6
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Aktivator-vermittelten TFIIA-, TFIID- und RNAP II-Anlagerungen beim Zusammenbau des Transkriptionskomplexes	15
Abb. 3:	Schematische Darstellung des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus	17
Abb. 4:	Schematische Darstellung der angenommenen Struktur von <i>Drosophila</i> TFIID	21
Abb. 5:	Einfluss des Virus-Replikationsinhibitors PAA auf die Morphologie von HFFF2-Zellen und auf den HSV-1-induzierten zytopathischen Effekt	43
Abb. 6:	Untersuchung des Einflusses von PAA auf die Erzeugung von Zellstress in HFFF2-Zellen	44
Abb. 7:	Mechanismus der RNAi	49
Abb. 8:	Test der Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode in Insektenzellen	51
Abb. 9:	Bestimmung der Insektenzellzahl und der Gesamtproteinzunahme während der AcMNPV-Infektion	53
Abb. 10:	Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	62
Abb. 11:	Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	64
Abb. 12:	Quantifizierung der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	65
Abb. 13:	Analyse der anti-SfTBP Antiserenspezifität	67
Abb. 14:	Kolokalisierungsstudien von TBP- und BrdU-markierten Replikationszentren im baculoviralen Infektionsverlauf	69
Abb. 15:	TBP-Relokalisierung in Abhängigkeit von baculoviraler Replikation	71
Abb. 16:	Kolokalisierung von TBP und RNAP II im baculoviralen Infektionsverlauf	73
Abb. 17:	Expression von LEF-4 in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen	75
Abb. 18:	Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Expression in Sf21-Zellen	77
Abb. 19:	TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen bei Hemmung der Translation 8 h p.i.	78
Abb. 20:	Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen bei Hemmung der Translation zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion	79
Abb. 21:	Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Relokalisierung im baculoviralen Infektionsverlauf	81
Abb. 22:	Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin im baculoviralen Infektionsverlauf	84

Abb. 23:	Kolokalisierungsstudien von TBP und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten Insektenzellen	86
Abb. 24:	Kolokalisierungsstudien von TBP und IE2 im baculoviralen Infektionsverlauf	88
Abb. 25:	Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in v-ubi AcMNPV-infizierten Insektenzellen	91
Abb. 26:	Funktionsnachweis der RNAi-Methode in Sf21-Zellen und Spezifitätskontrollen von dsRNAs	94
Abb. 27:	Etablierung der RNAi-Methode mit dsRNA IE2 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	97
Abb. 28:	Reduktion von IE2 durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf	100
Abb. 29:	Optimierung der RNAi-Methode für die Reduktion von DBP in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen	102
Abb. 30:	Reduktion von DBP durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf	105
Abb. 31:	Expression von LEF-4 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen und Titrierung von dsRNA LEF-4 für die RNAi-Methode	109
Abb. 32:	Inhibition von LEF-4 durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf	111
Abb. 33:	Auswirkungen der LEF-4-Reduktion auf die Baculovirus-Polyederbildung und die Virusproduktion	114
Abb. 34:	Einfluss von RNAi auf TBP in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen: Erste Untersuchungen	116
Abb. 35:	Einfluss der RNAi-Methode auf TBP im baculoviralen Infektionsverlauf	118
Abb. 36:	Analyse der TAF9-Expression im baculoviralen Infektionsverlauf	121
Abb. 37:	Analyse der TAF5-Expression im AcMNPV-Infektionsverlauf	123
Abb. 38:	Kolokalisierungsstudien von TAF5 und BrdU-markierten Replikationszentren im baculoviralen Infektionsverlauf	125
Abb. 39:	Nachweis der Expression basaler Transkriptionsfaktoren und Lokalisierung von TBP im HSV-1-Infektionsverlauf	127
Abb. 40:	Lokalisierung von ICP4 in BrdU-markierten Replikationszentren im HSV-1-Infektionsverlauf	129
Abb. 41:	Kolokalisierung von ICP4 und RNAP II im HSV-1-Infektionsverlauf	130
Abb. 42:	Titrierung des Virus-Replikationsinhibitors PAA während der HSV-1-Infektion	132
Abb. 43:	Kolokalisierung von TBP und ICP4 im HSV-1-Infektionsverlauf	133
Abb. 44:	Kolokalisierung von hsTAF1 und ICP4 während der HSV-1-Infektion	135

Abb. 45:	Kolokalisierung von hsTAF4 und ICP4 im HSV-1-Infektionsverlauf	137
Abb. 46:	Skizze zur Anlagerung basaler Transkriptionsfaktoren an frühe und späte Promotoren großer DNA-Viren	155

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Kernpolyedervirus („ <i>Autographa californica</i> multicapsid nuclear polyhedrosis virus“)
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> Kernpolyedervirus („nuclear polyhedrosis virus“)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
BV	„budded virus“-Phänotyp von Baculoviren
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CPE	zytopathischer Effekt („cytopathic effect“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein („enhanced green fluorescent protein“)
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
g	Gramm
G	Guanin
HFFF2	Primäre humane fötale Vorhaut-Fibroblasten („human caucasian foetal foreskin fibroblasts“)
h p.i.	Stunden nach Infektion („hours post infection“)
h p.t.	Stunden nach Transfektion („hours post transfection“)
hr	homologe Region („homologous region“)
HSV-1	<i>Herpes simplex</i> virus Typ 1
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LEF	„late expression factor“ von Baculoviren
M	Mol
mA	Milliampere

MDCK II	Säugerzelllinie „Madine-Darby canine kidney“ II
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
M.O.I.	Infektionsmultiplizität („multiplicity of infection“)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
OV	„occluded virus“-Phänotyp von Baculoviren
PAA	„phosphonoacetic acid“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pfu	Plaque-bildende Einheiten („plaque forming units“)
pI	isoelektrischer Punkt
pM	Picomol
P/S	Penicillin und Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNAi	RNA-Interferenz
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
sec.	Sekunden
Sf21	Insektenzelllinie <i>Spodoptera frugiperda</i> 21
T	Thymin
TN-368	Insektenzelllinie <i>Trichoplusia ni</i>
u.a.	unter anderem
un	uninfiziert
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
wt	Wildtyp
x g	fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

I. Einleitung

1. Viren – und die Bedeutung der Erforschung ihrer Wirtszell-Interaktionen

Als Viren bezeichnet man intrazelluläre Parasiten, die keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und somit auf die Infektion von Wirtszellen angewiesen sind, um neue Viruspartikel zu produzieren. Viren sind als Krankheitserreger in allen Organismenreichen zu finden, wobei ihre Wirtsspezifität unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Viren greifen in zelluläre Regulationsprozesse ein und steuern durch Wechselwirkungen von viralen und zellulären Faktoren die Wirtszellen so, dass vorrangig das virale Genom repliziert und virale Proteine synthetisiert werden (Übersichtsartikel von Schneider und Shenk, 1987). Die Steuerung dieser Prozesse geschieht durch virale Gene, die auf einem einzel- oder doppelsträngigen, aus DNA oder RNA bestehenden, linearen, ringförmigen oder segmentierten Virus-Genom kodiert sind. In den vollständigen, infektiösen Viruspartikeln (Virionen) wird die virale Nukleinsäure von einem aus Proteinen bestehenden Kapsid umgeben. Bei einigen Virustypen ist zusätzlich eine Membranhülle („envelope“) vorhanden, die zumeist aus einer von zellulären Membranen stammenden Lipiddoppelschicht und aus Glykoproteinen besteht. Dabei erreichen die Virionen Größen von 20 bis 300 nm im Durchmesser.

Die Geschichte der Virologie begann mit den ersten menschlichen Hochkulturen. Die ersten beschriebenen Vorgehensweisen, die man heute als „Impfungen“ gegen Viruserkrankungen bezeichnen würde, liegen bereits über 3000 Jahre zurück. Ohne genauere Kenntnisse der Erreger führte im alten China, Indien und Ägypten die Übertragung von getrocknetem Schorf von Pocken auf nicht erkrankte Personen dazu, dass diese zumindest teilweise vor der Infektion mit Pocken geschützt waren. Der Begriff „Virus“ (lateinisch für „Gift“) stammt aus der Zeit bevor Viren als Krankheitserreger erkannt wurden.

Das Jahr 1892 kann als Beginn der „modernen“ Virologie angesehen werden, als D. Iwanowski feststellte, dass die Mosaikkrankheit von Tabakpflanzen durch ein unter Bakteriengröße liegendes, „ultrafiltrierbares“ Agens, nämlich das Tabakmosaikvirus, verursacht wird. Das Maul-und-Klauenseuche-Virus wurde 1898 durch F. Loeffler und P. Frosch nachgewiesen und war damit das erste entdeckte tierpathogene Virus. Heute sind ca. 4000 Virenspezies bekannt, ihre tatsächliche Zahl dürfte aber erheblich höher liegen. Dies gilt v.a. für Viren, die keine Erkrankungen im Menschen oder in Nutztieren auslösen, bzw. die in

wenig bearbeiteten Forschungsfeldern, wie z.B. der marinen Virologie, anzusiedeln sind (Übersichtsartikel Fuhrman, 1999; Condit, 2001). Die meisten bekannten Viren wurden aufgrund ihrer Rolle als Krankheitserreger erkannt. In der heutigen Molekularbiologie versucht man jedoch Viren als nützliche Werkzeuge zur Aufklärung von molekularen Prozessen und allgemeinen Regulationsmechanismen in ihren Wirtszellen zu nutzen.

So wurde z.B. durch die Untersuchung der Transkription von Adenovirus-Genen das Spleißen von mRNA entdeckt (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977; Berk und Sharp, 1978). Studien über SV40 (simian virus 40) ermöglichten die Aufklärung der Struktur und Funktion von cis-regulatorischen Verstärkerelementen („enhancer“) (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981), und Arbeiten über sein großes T Antigen führten zur Entdeckung einer Proteinsequenz, die als Importsignal von Proteinen in den Zellkern dient (Kalderon et al., 1984; Goldfarb et al., 1986; Lanford et al., 1986). Des Weiteren führte die Erforschung von viraler Genexpression zur Aufklärung der Funktionen regulatorischer Proteine der Zelle, wie z.B. des Transkriptionsfaktors Sp1 (Dyan und Tjian, 1983) oder des Tumor-Suppressor-Proteins Rb (Chellapan et al., 1991; Bandara und La Thangue, 1991).

2. Das *Autographa californica* Kernpolyedervirus (AcMNPV) ist ein Mitglied der Virus-Familie Baculoviridae

Baculoviren bilden eine für Invertebraten pathogene Virus-Familie. Baculovirus-Infektionen sind in über 600 Insektenarten der Ordnungen Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera und Coleoptera beschrieben worden (Übersichtsartikel Blissard und Rohrmann, 1990). Baculoviren besitzen ein zwischen 90 und 160 kbp großes Genom, welches aus doppelsträngiger, zirkulärer und superhelikaler DNA besteht. Das Genom ist von einem stäbchenförmigen, membranumhüllten Kapsid umgeben, welches der Virus-Familie ihren Namen verliehen hat („baculum“ lateinisch für Stab).

Das Kapsid wird außerhalb seines Wirts zum Schutz gegen Umwelteinflüsse von kristallinen Einschlusskörpern (Polyeder) umgeben. Je nach Art der Polyeder werden diese von den viralen Proteinen Polyhedrin oder Granulin gebildet (Rohrmann, 1986). Daher unterscheidet man Granuloseviren, die nur ein einzelnes Virion pro Einschlusskörper enthalten, und Kernpolyederviren („nuclear polyhedrosis viruses“, NPVs), die zahlreiche Virionen in jedes Polyeder verpacken, und in zwei Formen vorkommen. Bei SNPVs („singlecapsid nuclear polyhedrosis viruses“) liegen die Nukleokapside einzeln, bei den MNPVs („multicapsid

nuclear polyhedrosis viruses“) dagegen zu mehreren gebündelt in einer Membranhülle vor (Übersichtsartikel Friesen und Miller, 2001).

Das am besten untersuchte Baculovirus ist das AcMNPV („*Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus“) mit einem DNA-Genom von 133894 bp, welches für 337 potentielle offene Leseraster („open reading frames“, ORFs) kodiert (Ayres et al., 1994). AcMNPV befällt Insektenlarven der Ordnung Lepidoptera und wurde erstmalig aus Larven des Nachtfalters *Autographa californica* isoliert (Vail et al., 1971). Es besitzt ein relativ breites Wirtsspektrum, das mindestens 33 Spezies aus zehn Insektenfamilien umfasst, aus denen 25 für AcMNPV permissive Zelllinien bekannt sind (Hink, 1980; Gröner, 1986; Hink und Hall, 1989).

Das Baculovirussystem ermöglicht Untersuchungen von Virus-Wirtszell-Interaktionen auf der einen Seite in *in vivo* Modellen durch Infektionsstudien in Insektenlarven, andererseits stehen mit Zellkultursystemen *in vitro* Modelle zur Erforschung molekularer Aspekte der Virusinfektion zur Verfügung.

2.1. Verwendungsgebiete von Baculoviren

Ein Ziel der Baculovirusforschung besteht darin, die dramatischen Effekte ihrer Infektion auf Insektenlarven als Erreger der Polyhedrose für den Menschen nutzbar zu machen. Die Tatsache, dass keine produktive Baculovirusinfektion in Vertebraten festgestellt werden konnte und das Wirtsspektrum v.a. auf Insekten beschränkt ist, macht Baculoviren als biologisches Pestizid in der Schädlingsbekämpfung für die Land- und Forstwirtschaft interessant. Ein großer Teil der Forschungen beschäftigt sich daher mit der gezielten Veränderung des baculoviralen Genoms, um die insektenpathogenen Eigenschaften durch die Insertion von insektenspezifischen Toxinen in das Virusgenom zu verstärken (Übersichtsartikel Bishop, 1988; Inceoglu et al., 2001).

Ein anderer wichtiger Aspekt der kommerziellen Baculovirusnutzung ist ihr Einsatz als eukaryotisches Vektorsystem zur Überexpression von funktionellen Genen für biotechnologische und medizinische Forschungszwecke (Smith et al., 1983; Übersichtsartikel Luckow und Summers, 1988; O'Reilly et al., 1992; Übersichtsartikel Kost et al., 2005). Ein Vorteil gegenüber anderen Vektorsystemen besteht darin, dass Baculoviren große Mengen fremder DNA stabil in ihr Genom integrieren können, und dass durch die Verwendung der in Zellkulturen für die Virus-Entwicklung nicht essentiellen Promotoren des p10- und polyhedrin-Gens eine starke Überexpression der Fremdgene möglich ist. Vorteilhaft für die

Produktion biologisch aktiver Proteine ist dabei auch, dass die posttranslationalen Modifikationen in Insektenzellen denen der Vertebraten mit wenigen Ausnahmen sehr ähnlich sind (King und Possee, 1992; O'Reilly et al., 1992).

Das begrenzte Wirtsspektrum, die Möglichkeit der Expression von therapeutisch wirksamen Fremdgenen und ihre im Vergleich zu anderen Viren leichte Handhabung führten zu Untersuchungen der Verwendungsmöglichkeiten von Baculoviren als Vektorsystem in der Gentherapie (Hofman et al., 1995; Boyce und Bucher, 1996; Übersichtsartikel Hu, 2005). Der Vorteil des Einsatzes von Baculoviren besteht darin, dass sie zwar in Vertebratenzellen eindringen, aber nicht in ihnen replizieren können. Außerdem existiert gegen Baculoviren keine bestehende zelluläre Immunantwort, wenngleich gezeigt wurde, dass sie durch das Komplementsystem des Säugerserums stark inhibiert werden können (Hofman und Strauss, 1998; Übersichtsartikel Boyce, 1999).

Es werden hohe Ansprüche an die Sicherheit eines Virussystems gestellt, um es kommerziell nutzbar zu machen. Daher ist die Untersuchung von Baculoviren auf molekularer Ebene von großem Interesse. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Erforschung der Baculovirus-Wirtszell-Interaktionen, wodurch ein Modellsystem zur Untersuchung von zellulären und viralen Regulationsmechanismen im Infektionsverlauf großer DNA-Viren zur Verfügung steht.

2.2. Der baculovirale Infektionszyklus

Das Vorkommen von zwei verschiedenen Phänotypen, die unterschiedliche Funktionen während des Infektionsverlaufs erfüllen, stellt eine Besonderheit von Baculoviren dar (Volkman, 1986; O'Reilly et al., 1992). In der Natur können Baculoviren bis zu mehrere Jahre in Form des „occluded virus“ (OV) als Polyeder funktionsfähig überdauern, da die Organisation in Polyedern die Virionen vor Hitze, niedrigen pH-Werten und Chemikalien schützt. Unter natürlichen Bedingungen werden Insektenlarven infiziert, indem sie mit Viruspolyedern kontaminierte Nahrung aufnehmen, womit die Polyeder für die horizontale Verbreitung der Baculovirus-Infektion innerhalb einer Insektenpopulation verantwortlich sind. Die Polyeder werden im alkalischen Milieu des Mitteldarms (pH 8-11) der Larven aufgelöst (Übersichtsartikel Federici, 1997). Dadurch erfolgt die Freisetzung der membranumhüllten Nukleokapside („occlusion-derived virus“, ODV) in das Darmlumen und die Auslösung der Primärinfektion der Insektenlarve (Abb. 1 B). Dabei fusionieren die Membranen der ODVs mit den Membranen von Mitteldarm-Epithelzellen, und die

Nukleokapside werden in das Zytoplasma der Zellen entlassen (Granados und Williams, 1986). Möglicherweise findet ein Transport der Nukleokapside entlang virusinduzierter Aktinfilamente zum Zellkern statt (Charlton und Volkman, 1993). Die genauen Mechanismen des Transports und des Eintritts der Nukleokapside in den Zellkern sind bisher unbekannt.

Mit der Freisetzung der viralen DNA im Zellkern beginnt die frühe Phase der viralen Genexpression, welche die virale DNA-Replikation vorbereitet. Die Virus-DNA wird in der späten Infektionsphase repliziert, wobei gleichzeitig die Expression der späten viralen Faktoren und somit die Synthese von viralen Strukturproteinen zum Zusammenbau neuer Viruspartikel stattfindet. Die entstehenden Virionen repräsentieren den zweiten Phänotyp der Baculoviren, der als „knospendes Virus“ („budded virus“, BV) oder nicht umhülltes Virus („nonoccluded virus“, NOV) bezeichnet wird (Abb. 1 B).

Bei der folgenden Sekundärinfektion der Larve gelangen die BVs aus dem Kern und verlassen den Mitteldarm durch Knospung aus der Basallamina der Epithelzellen in die Hämolymphe oder das Tracheensystem der Larve, wobei sie eine Membranhülle erhalten, deren Hauptprotein das virale Glykoprotein GP64 ist (Keddie et al., 1989; Übersichtsartikel Friesen und Miller, 2001). Durch das endozytotische, GP64-vermittelte Eindringen in andere Zelltypen des Wirts wird die Infektion auf andere Organe der Larve verbreitet (Abb. 1 A).

In sekundär infizierten Zellen der Larve kommt es nach der späten Infektionsphase zur Hyperexpression der sehr späten viralen Gene polyhedrin und p10. Mit der Expression dieser Gene in der sehr späten Phase der Infektion beginnt der Zusammenbau neuer Einschlusskörper im Zellkern, wobei die Nukleokapside wahrscheinlich von einer *de novo* synthetisierten Membran umgeben werden. Die sekundär infizierten Zellen werden anschließend lysiert, wobei ungefähr 5 Tage nach Beginn der Erstinfektion die vollständige Lyse einer infizierten Larve und ihre Umwandlung in eine amorphe Masse abgeschlossen ist. Die Polyeder können über 10% des Trockengewichts einer gestorbenen Larve ausmachen. Diese Krankheit der Insekten wird als Polyhedrose bezeichnet (Übersichtsartikel Friesen und Miller, 2001).

Im Gegensatz zur *in vivo*-Situation in Larven sind für Zellkulturinfektionen *in vitro* nur die BVs infektiös (Abb. 1 A). In Zellkultur sind die genauen Zeiten der Infektionsphasen abhängig von der Infektionsmultiplizität („multiplicity of infection“, M.O.I.), welche der Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Zelle entspricht, und von der verwendeten Zelllinie. Die frühe Infektionsphase läuft in der Regel von 0 bis 6 Stunden nach Infektion („hours post infection“, h p.i.) ab. Die späte Infektionsphase mit der Replikation der Virus-DNA, der Expression der späten viralen Faktoren und somit der Synthese von viralen Strukturproteinen

findet in Zellkultur von ca. 6 bis 24 h p.i. statt. In der späten Infektionsphase ab ca. 12 h p.i. wird ein zytopathischer Effekt („cytopathic effect“, CPE) sichtbar, bei dem die Wirtszellen runder und die Zellkerne größer werden, sowie die Nucleoli verschwinden.

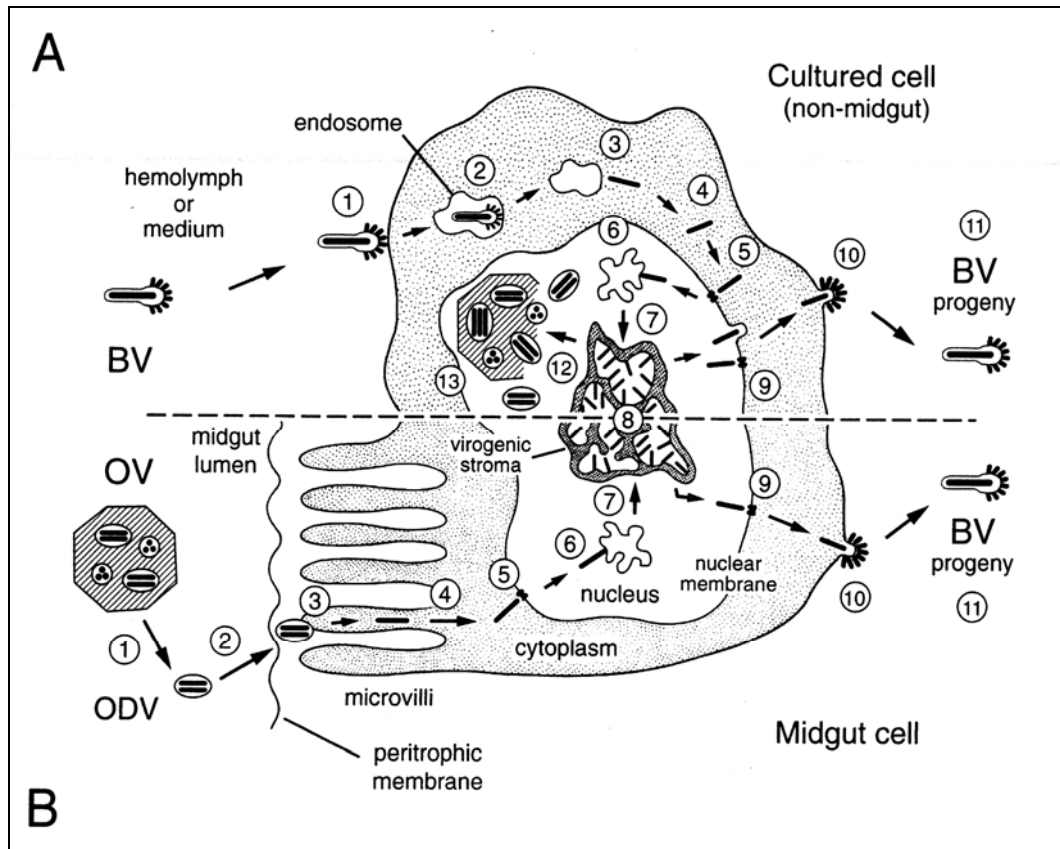


Abb. 1: Graphische Darstellung des Infektionszyklus von AcMNPV

A) Infektion einer Zelle in Zellkultur durch BVs. Bindung eines BV an Zelloberflächenrezeptoren (1) und Eintritt durch Endozytose (2). Die Virusmembran fusioniert mit der Membran des Endosoms (3). Freigesetzte Nukleokapside wandern im Zytoplasma zum Zellkern (4) und interagieren mit dem Kernporenkomplex (5). Die virale DNA wird freigesetzt (6) und transkribiert (7). Die Virus-DNA wird im virogenen Stroma repliziert und in Nukleokapside verpackt (8). In der späten Infektionsphase verlassen die Nukleokapside den Zellkern (9) und schnüren sich von der Plasmamembran ab (10), wodurch infektiöse BVs entstehen (11). In der sehr späten Phase verbleiben die Nukleokapside im Zellkern, werden mit einer Membran umhüllt (12) und in Polyeder verpackt (13). **B)** Infektion einer Mitteldarmepithelzelle *in vivo* durch OV. Die Polyhedrinmatrix wird im alkalischen Milieu des Mitteldarms aufgelöst (1), wodurch ODVs freigesetzt werden, die die peritrophische Membran durchqueren (2) und mit der Mikrovillimembran der Zelle fusionieren (3). Die weiteren Schritte sind vergleichbar mit denen unter Punkt A) (aus Friesen und Miller, 2001).

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen ist eine Umstrukturierung des Zellkerns beschrieben worden, wodurch in der Mitte des Kerns das virogene Stroma entsteht. Es wird vermutet, dass dies die Stelle im Kern sein könnte, an der die Replikation und Kondensation der viralen DNA, und anschließend ihre Verpackung in Nukleokapside stattfindet (Übersichtsartikel Volkman und Keddie, 1990; Miller, 1996). Die sehr späte Phase der Infektion beginnt in Zellkultur 18 bis 24 h p.i. und endet mit der Lyse der Zelle ca. drei bis vier Tage nach dem Infektionsbeginn. Während dieser Phase werden die sehr späten viralen

Gene polyhedrin und p10 hyperexprimiert, so dass 24 h p.i. über 90% der gebildeten mRNAs Transkripte für Polyhedrin und P10 sind. Dies führt dazu, dass ungefähr 70 h p.i. ca. 20% der Gesamtproteinmenge der infizierten Zelle aus Polyhedrin besteht (Volkman und Keddie, 1990). Mit der Expression dieser Gene beginnt der Zusammenbau von viralen Einschlusskörpern im Zellkern, wobei die Nukleokapside wahrscheinlich von einer *de novo* synthetisierten Membran umgeben werden. Die mit vielen Virionen gefüllten Polyeder werden schließlich durch Lyse der Wirtszellen ins Zellkulturmedium freigesetzt.

2.3. Baculovirale Genexpression

Das baculovirale Genom wird in einer aufeinanderfolgenden und koordinierten Genexpressionskaskade exprimiert, wodurch sich die Infektion in Insektenzellen in drei Hauptphasen einteilen lässt.

In der frühen Phase der Infektion findet die Transkription der frühen viralen Faktoren statt, die zur Initiation der viralen DNA-Replikation benötigt werden. Die ersten Transkripte der sehr frühen Gene werden unabhängig von anderen viralen Faktoren gebildet und lassen sich ab 1 h p.i. nachweisen (Guarino und Summers, 1986 a; Carson et al., 1991 a; Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991; Knebel-Mörsdorf et al., 1993). Bisher sind die fünf sehr frühen Faktoren IE1 („immediate early gene 1“), IE0, IE2, PE38 und ME53 bekannt.

Für das IE1-Protein ist gezeigt worden, dass es frühe virale Promotoren transaktivieren kann (Guarino und Summers, 1986 a; Blissard und Rohrmann, 1991; Lu und Carstens, 1993) und auch für die späte Genexpression benötigt wird (Passarelli und Miller, 1993). Neuere Studien mit GFP-markiertem IE1 zeigen, dass es in der späten Infektionsphase im virogenen Stroma lokalisiert (Kawasaki et al., 2004). IE1 übt seine Funktion als Transaktivator sowohl sequenzunabhängig, als auch in Abhängigkeit von homologen Regionen (HR-Regionen) aus, die als Enhancer-Elemente der viralen Genexpression (Guarino et al., 1986; Guarino und Summers, 1986 b; Lu und Carstens, 1993) und als Startpunkte der viralen DNA-Synthese (Pearson et al., 1992; Kool et al., 1993; Leisy und Rohrmann, 1993) dienen.

Bei IE0 handelt es sich um eine gespleißte Variante von IE1, die durch die Fusion eines weiteren Exons an das IE1-Transkript entsteht, wodurch ein um 54 Aminosäuren N-terminal verlängertes IE1-Protein gebildet wird (Chisholm und Henner, 1988). Für IE0 sind andere transaktivierende Eigenschaften als für IE1 gezeigt worden (Kovacs et al., 1991). Für Wildtyp-Infektionen sind sowohl IE1 als auch IE0 erforderlich, da AcMNPV-Mutanten, denen eines der beiden Proteine fehlt, weniger Polyeder produzieren (Stewart et al., 2005).

Die beiden sehr früh exprimierten Gene IE2 und PE38 enthalten Aminosäuresequenzen für ein C₃HC₄- oder „RING“-Finger-Motiv, das als DNA-bindende Domäne fungieren kann (Freemont et al., 1991; Lovering et al., 1993). Bei PE38 befindet es sich in der Nähe des N-Terminus und bei IE2 im Zentrum des Proteins. Außerdem besitzen PE38 und IE2 am C-Terminus einen „Leucin-Zipper“, der als Dimerisierungs- und als DNA-Binde-Domäne dient (Carson et al., 1991 b; Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991; Yoo und Guarino, 1994 a; Krappa et al., 1995). Diese Strukturen weisen auf regulatorische Funktionen der beiden Faktoren hin. In Studien sind für PE38 und IE2 Funktionen von der Transaktivierung viraler Promotoren bis zur Regulation von Wirtszell-Funktionen nachgewiesen. IE2 ist in transienten Expressionsstudien zunächst als Faktor identifiziert worden, der die Transaktivierung des viralen 39K-Promotors durch IE1 verstärken kann. Durch eine starke Erhöhung der IE1-Konzentration wird die Transaktivierungsfähigkeit von IE2 allerdings aufgehoben (Carson et al., 1988). IE2 ist zudem in der Lage die Expression von den Promotoren der Gene *ie1* und *ie0* zu aktivieren, und besitzt zusätzlich autoregulatorische Funktionen, indem es die Aktivität seines eigenen Promotors steigern kann (Carson et al., 1991 a, b). Somit wird IE2 als transkriptioneller Regulator angesehen (Yoo und Guarino, 1994 a, b). Transiente Expressionsstudien zeigen, dass IE2 die Replikation von Plasmiden und die Expression später viraler Gene stimulieren kann. Allerdings sind diese Ereignisse nur in der Anwesenheit von sechs anderen AcMNPV-Genen zu beobachten, weshalb diese stimulatorischen Effekte durch IE2 auf die Aktivierung anderer viraler Gene zurückzuführen sein könnten (Passarelli und Miller, 1993; Lu und Miller, 1995). AcMNPV-Mutanten, die ein unvollständiges *ie2*-Gen besitzen, zeigen Verzögerungen in der viralen Replikation, in der Expression der späten Gene und in der Produktion beider Virus-Phänotypen in Sf21-Zellen, jedoch nicht in der Zelllinie TN-5B1-4 (Prihod'ko et al., 1999). Der OV-Form der IE2-Mutanten fehlen Virionen, wodurch ihre orale Infektiosität für Larven vermindert ist. Dagegen bleibt die BV-Form der IE2-Mutanten bei der Injektion ins Hämocoel ähnlich infektiös wie die Wildtyp-Viren. Es gibt gegenwärtig keine offensichtliche Korrelation zwischen den mutanten Phänotypen und den Transaktivierungsfähigkeiten von IE2 (Prihod'ko et al., 1999). Eine IE2-Mutante des homologen *Bombyx mori* Kernpolyedervirus (BmNPV) zeigt eine Verzögerung der viralen DNA-Replikation, obwohl ihre Wachstumsrate in BmN-4-Zellen nicht beeinflusst wird (Gomi et al., 1997). Es ist beschrieben worden, dass AcMNPV IE2 nach transienter Expression das Fortschreiten des Zellzyklus in der S-Phase blockieren kann (Prihod'ko und Miller, 1998). Zur Definition der IE2-Region, die für diesen Effekt entscheidend ist, sind IE2-Mutanten untersucht worden. IE2-Mutanten, denen der „RING“-Finger fehlt, haben nicht die

Fähigkeit den Zellzyklus zu hemmen, aber können weiterhin den IE1-Promotor in transienten Expressionsstudien transaktivieren. Wie für andere Mitglieder der „RING“-Finger-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass BmNPV IE2 als Ubiquitin-Ligase (E3-Enzym) fungieren kann (Imai et al., 2003). Wie kürzlich beschrieben worden ist, scheint der Ubiquitin-Proteasomen-Weg auch eine Rolle bei der Regulation des IE2-Proteins selber zu spielen, wobei dies durch eine Auto-Ubiquitinierung von IE2 gesteuert sein könnte (Imai et al., 2005).

Die Funktion des fünften sehr frühen viralen Faktors ME53 (Knebel-Mörsdorf et al., 1993) konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Die Aktivität nachfolgend exprimierter früher viraler Faktoren findet mit einer zeitlichen Verzögerung statt, und ist möglicherweise abhängig von den Produkten der sehr frühen Gene (Guarino und Summers, 1986 a; Lu und Carstens, 1993). Die Genprodukte der früh exprimierten Gene werden für die DNA-Replikation der Viren benötigt. Zu den für die DNA-Replikation wichtigen viralen Faktoren gehören eine vom viralen Genom kodierte DNA-Polymerase und das Gen p143, das für ein Protein mit Helikase-Funktion kodiert (Tomalski et al., 1988; Lu und Carstens, 1991). In der frühen Phase der Infektion wird auch das virale Protein DBP (DNA-Binde-Protein) exprimiert. Für das DBP des *Bombyx mori* Kernpolyedervirus (BmNPV), das eine 96%ige Homologie zum AcMNPV DBP aufweist, ist gezeigt worden, dass es vorzugsweise einzelsträngige DNA bindet und DNA-Doppelhelices *in vitro* entwinden kann (Mikhailov et al., 1998). Es ist vermutet worden, dass DBP regulatorische Funktionen bei der Replikation des viralen Genoms ausüben könnte, da sowohl das BmNPV DBP als auch das AcMNPV DBP-Protein an Orten der viralen DNA-Replikation zu finden ist (Okano et al., 1999; Mainz et al., 2002). Das Genprodukt des lef-3 („late expression factor 3“) Gens ist als einer von sechs essentiellen viralen Faktoren der Replikation von Plasmid-DNA von einem baculoviralen Replikations-Startpunkt aus beschrieben worden (Kool et al., 1994). Da es einzelsträngige DNA binden kann, könnte es als SSB-Protein („single strand binding protein“) fungieren (Hang et al., 1995; Evans und Rohrmann, 1997). Kürzlich ist beschrieben worden, dass LEF-3 zusammen mit IE1 und der viralen DNA-Helikase P143 *in vivo* an denselben Stellen auf dem viralen Chromatin bindet und dort vermutlich an der Ausbildung von Replikationskomplexen beteiligt ist (Ito et al., 2004). LEF-3 besitzt dabei neben der Aufgabe des Transports von P143 in den Zellkern weitere essentielle Funktionen für die virale Replikation (Chen und Carstens, 2005). Auch andere LEFs („late expression factors“) werden in der frühen Infektionsphase exprimiert, und sind für die Expression einiger später und sehr später Faktoren notwendig (Li et al., 1993; Lu und Miller, 1995; Todd et al., 1996). An dieser

Stelle sei das P35-Protein hervorgehoben, das als LEF zum einen eine Funktion bei der Blockierung der zellulären Proteinsynthese ausübt (Du und Thiem, 1997). Zum anderen spielt es eine entscheidende Rolle in der Apoptoseinhibition durch Hemmung von zellulären Caspasen (Hershberger et al., 1994; LaCount et al., 2000; Vier et al., 2000). Baculoviren besitzen mit den IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“) darüber hinaus eine zweite Klasse von anti-apoptotischen Proteinen, die durch Inhibition von pro-apoptotischen Insektenproteinen wirken (Clem, 2001; Übersichtsartikel Clem, 2005).

Die späte virale Genexpression unterliegt einem Regulationsmechanismus, der von der Replikation der Virus-DNA frühestens ab 6 h p.i., sowie von der Synthese früher viraler Proteine abhängig ist (Grula et al., 1981; Fuchs et al., 1983; Blissard et al., 1996).

Mit dem Beginn der späten Genexpression beginnt in den Zellkernen der Zusammenbau von neuen Nukleokapsiden, die bei der Knospung durch die Plasmamembran ihre Membranhülle erhalten (Miller, 1996; Blissard, 1996). Dazu ist die Synthese viraler Strukturproteine notwendig, die wie im Fall des BV-Membranproteins GP64 sowohl durch eine frühe, als auch durch eine späte Promotoraktivität erfolgen kann (Blissard und Rohrmann, 1989; Jarvis und Garcia, 1994). Dagegen findet die Expression des in BVs und ODVs vorzufindenden Kapsidproteins P39 ausschließlich in der späten Infektionsphase statt (Pearson et al., 1988; Blissard et al., 1989). Neben der Funktion als virales Strukturprotein scheint P39 eine Funktion bei der Bindung von Aktin der Wirtszelle zu haben, da es mit Aktin in Hefe-2-Hybridssystemen interagieren kann (Lu et al., 2002).

In der sehr späten Phase der Infektion ab ca. 18-24 h p.i. findet die zur Produktion der Einschlusskörper wichtige Hyperexpression der viralen Gene polyhedrin und p10 statt. P10 hat eine Funktion bei der Lyse der Wirtszellen, so dass ohne P10 die Kernmembran am Ende der Infektion nicht aufgelöst wird und die Polyeder nicht freigesetzt werden (Williams et al., 1989; van Oers et al., 1993; Friesen und Miller, 2001). Polyhedrin stellt die Hauptkomponente der Einschlusskörpermatrix dar (Rohrmann, 1986). Die sehr späten Promotorsysteme der Baculoviren gehören zu den stärksten bisher bekannten Promotoren und werden bei den baculoviralen Überexpressionssystemen genutzt (King und Possee, 1992; O'Reilly et al., 1992).

Die Transkription der frühen und späten viralen Gene findet durch verschiedene RNA-Polymerasen statt. Die frühen viralen Promotoren werden von der RNA-Polymerase II der Wirtszelle erkannt, die durch α -Amanitin blockiert werden kann (Fuchs et al., 1983). Die Beteiligung zellulärer Transkriptionsfaktoren wird daher vermutet, ist jedoch nicht gezeigt worden (Rasmussen und Rohrmann, 1994).

Zur Transkription der späten und sehr späten viralen Faktoren wird dagegen eine α -Amanitin resistente RNA-Polymerase benötigt (Grula et al., 1981; Fuchs et al., 1983; Huh und Weaver, 1990). Bei dieser RNA-Polymerase handelt es sich um ein vom Virus kodiertes Enzym, welches aus den vier äquimolaren, viralen Proteinuntereinheiten LEF-4, LEF-8, LEF-9 und p47 besteht (Yang et al., 1991; Guarino et al., 1998 a). Aufgrund von Sequenzhomologien wird angenommen, dass LEF-8 und LEF-9 katalytische Untereinheiten der RNA-Polymerase sein könnten, wobei der C-terminalen Domäne von LEF-8 entscheidende Funktionen zukommen (Lu and Miller, 1994; Passarelli et al., 1994; Titterington et al., 2003). Die Synthese von LEF-8 und LEF-9 wird früh in der Infektion initiiert und erreicht die maximale Expressionsstärke in der sehr späten Infektionsphase (Acharya und Gopinathan, 2002). Temperatursensitive Mutanten zeigten, dass die Gene *lef-4* und *p47* möglicherweise essentielle Rollen für die Transkription später und sehr später Gene spielen könnten (Partington et al., 1990; Carstens et al., 1994). Weitere Studien haben ergeben, dass LEF-4 Guanylyltransferaseaktivitäten für die Bildung von m7G-Kappen am 5'-Ende viraler mRNAs besitzt und zusätzlich RNA 5'-Triphosphatase- und ATPase-Aktivitäten aufweist (Guarino et al., 1998 b; Jin et al., 1998).

Generell wird die Synthese der Wirtszellproteine während des Infektionsverlaufes schrittweise herunter reguliert (Carstens et al., 1979; Wood, 1980). Über zelluläre Faktoren, die an der späten oder sehr späten viralen Transkription beteiligt sind, ist bisher nichts bekannt. Dagegen gibt es, wie in diesem Abschnitt beschrieben, eine Reihe früh exprimierter viraler Faktoren, die essentiell oder unterstützend in der viralen DNA-Replikation und der Transkription später bzw. sehr später Virusgene involviert sind.

In transienten Expressionsstudien sind achtzehn AcMNPV-Gene beschrieben worden, die als notwendige und ausreichende Faktoren für die späte und sehr späte Virustranskription identifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um die Gene *ie1*, *ie2*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *lef-4*, *lef-5*, *lef-6*, *lef-7*, *lef-8*, *lef-9*, *lef-10*, *lef-11*, *39k*, *p47*, *p143*, *dnapol* und *p35* (Todd et al., 1996). Für die Expression der sehr späten Faktoren ist das spät exprimierte virale Protein VLF-1 („very late factor 1“) durch Interaktionen mit Promotorsequenzen der *p10*- und *polyhedrin*-Gene notwendig (McLachlin und Miller, 1994; Yang und Miller, 1999).

Die Charakterisierung der Promotoren der späten und sehr späten Baculovirusgene zeigt, dass ihre Transkription an einem TAAG-Sequenzmotiv initiiert wird, welches ein essentielles Element beider Promotorklassen ist. Die Expressionsstärke der späten Promotoren ist vom Kontext des TAAG-Motivs abhängig (Morris und Miller, 1994). Die Expressionsstärke der sehr späten Gene hängt zusätzlich von der Sequenz zwischen dem TAAG-Motiv und der

Translations-Initiationsstelle ab. Diese Sequenz ist erforderlich für die Hyperexpression in der sehr späten Infektionsphase und Mutationen in ihr reduzieren die Polyhedrin-Expression 2- bis 20-fach (Possee und Howard, 1987; Rankin et al., 1988; Weyer und Possee, 1988; Ooi et al., 1989; Mans und Knebel-Mörsdorf, 1998). Die sehr späten Promotoren enthalten TATA-Box ähnliche Sequenzen. Diese Sequenzen sind jedoch nicht essentiell für die Expression der Gene, da Mutationen der Promotorbereiche stromaufwärts der Transkriptionsinitiationssequenz nur geringe Effekte auf die sehr späte Genexpression haben (Weyer und Possee, 1989).

3. *Herpes simplex* Virus Typ 1 (HSV-1), ein Mitglied der Familie der Herpesviridae

Die Familie der Herpesviren zählt, wie die der Baculoviren, zu den großen DNA-Viren. Beide Virusfamilien ähneln sich darin, dass die viralen Genexpressionskaskaden in einem zeitlich regulierten Zyklus im Zellkern der Wirtszellen stattfinden (Übersichtsartikel Roizman und Sears, 1996). Im Gegensatz zur baculoviralen Genexpression werden jedoch die Gene von HSV-1 sowohl in der frühen als auch in der späten Infektionsphase von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert.

Herpesviren werden in drei Unterfamilien eingeteilt: Die α -, β - und γ -Herpesviren, die sich v.a. in ihrem Wirtsspektrum und in der Dauer ihrer Replikationszyklen unterscheiden. Der natürliche Wirt von HSV-1 ist der Mensch. Als Vertreter der α -Herpesviren hat HSV-1 jedoch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus und persistiert *in vivo* in Nervenzellen der Ganglien. Das HSV-1-Genom besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA und wird von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches von einer proteinhaltigen Matrix (Tegument) und einer Lipidmembran umgeben wird (Übersichtsartikel Roizman und Sears, 1996).

3.1. Genexpressionskaskade und *in vitro*-Infektion von HSV-1

HSV-1 ist in der Lage eine große Zahl von Zelltypen aus verschiedenen Säugerspezies *in vitro* zu infizieren. Die initiale Adsorption des Virus an die Zelloberfläche wird von viralen Glykoproteinen gesteuert. Der für die anschließende Penetration des Virions ins Zytoplasma am häufigsten beschriebene Mechanismus geht von einer pH-unabhängigen Fusion der

viralen Hüllmembran mit der Zellmembran aus, wobei auch die endozytotische Aufnahme der Viren möglich ist (Übersichtsartikel Spear et al., 2000; Nicola et al., 2003).

Wie bei Baculoviren wird auch die kaskadenartig ablaufende Genexpression von HSV-1 zeitlich genau reguliert (Übersichtsartikel Roizman und Sears, 1996). Im Gegensatz zur Baculovirusinfektion, bei der es beim Übergang in die späte Infektionsphase zu einem Wechsel zu einer viruskodierten RNA-Polymerase kommt, werden die HSV-1-Gene durchgehend von der zellulären RNA-Polymerase II abgelesen. Dazu ist ein Wechsel der RNA-Polymerase II-Transkriptionsaktivität von einer zellulären zu einer viralen Genexpression notwendig. Dieser Vorgang wird von einer Rekrutierung der RNA-Polymerase II in virale DNA-Replikationskompartimente und einer Phosphorylierung ihrer großen Untereinheit begleitet (Rice et al., 1994, 1995; Leopardi et al., 1997; Spencer et al., 1997). Des Weiteren führt die HSV-1-Infektion zu einem Verlust des generellen Transkriptionsfaktors TFIIE vom RNA-Polymerase II-Holoenzym (Jenkins und Spencer, 2001).

Die Expression der meisten zellulären Gene wird während der HSV-1-Infektion durch die Wirkung der viralen mRNA-spezifischen RNase Vhs („virus-host shutoff“) unterdrückt (Übersichtsartikel Smiley, 2004). Außerdem ist HSV-1 in der Lage die Funktion des zellulären Translationsapparates zu verändern (Laurent et al., 1998).

Die Expression der sehr frühen viralen Faktoren (α -Gene) wird durch das Tegumentprotein VP16 (Virionprotein 16) verstärkt. Die α -Gene kodieren für fünf Proteine, die die Promotoren der frühen Gene (β -Gene) steuern. Dabei agiert ICP0 („infected cell protein 0“) als viraler Transaktivator und kann als „RING-Finger“-Protein, wie für das baculovirale IE2-Protein beschrieben, als E3-Ubiquitin-Ligase in Proteasomen-abhängigen Proteinabbauwegen fungieren (Everett, 2000; Boutell et al., 2002; Hagglund et al., 2002). Das 175 kDa große ICP4 Protein ist essentiell für die Virusreplikation und induziert mit Ausnahme der α -Gene die Expression aller anderen Leserahmen (Preston, 1979; DeLuca et al., 1985). Die β -Gene kodieren für Proteine, die an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind. Die virale Replikation erfolgt während des lytischen Infektionszyklus nach dem Prinzip des „rolling circle“. Mit Beginn der viralen DNA-Synthese werden die späten Gene (γ -Gene) exprimiert, die für Strukturproteine und Faktoren kodieren, die am Zusammenbau und der Freisetzung der Virionen beteiligt sind (Roizman und Sears, 1996). Die Zusammensetzung der Virionen ist ein komplexer Prozess, der in verschiedenen Kompartimenten der Zelle abläuft. *In vitro* werden die Viren einerseits als CRV („cell released virus“) in die extrazelluläre Umgebung abgegeben, andererseits findet in der späten Infektionsphase eine Freisetzung von intrazellulär akkumulierten Viruspartikeln als CAV („cell associated virus“) durch Lyse der Zellen statt.

4. TBP als basaler Transkriptionsfaktor in eukaryotischen Transkriptionskomplexen

Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch drei verschiedene RNA-Polymerasen (RNAP) vermittelt. Die RNAP I lokalisiert in den Nukleoli und katalysiert die Bildung ribosomaler RNAs (rRNAs), während die RNAP III für die Transkription von tRNAs (Transfer-RNAs), der 5S rRNA und von weiteren kleineren RNAs im Nukleoplasma verantwortlich ist. Die Transkription proteinkodierender Gene erfolgt durch die RNAP II, welche einen Proteinkomplex aus zwölf Untereinheiten und einem Molekulargewicht von über 500 kDa darstellt (Weaver, 2002). An der Ausbildung des Präinitiationskomplexes an Promotoren für die Transkription durch die RNAP II ist eine Reihe von generellen Transkriptionsfaktoren beteiligt, die als TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF und TFIH bezeichnet werden, und die für die Transkription nahezu aller Gene notwendig sind. Ein zentraler Schritt der Transkriptionsinitiation ist die Bindung des größten Transkriptionsfaktors TFIID an die TATA-Box etwa 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Buratowski et al., 1989; Roeder, 1996).

TFIID besteht aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und mindestens zwölf bis vierzehn TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) (Roeder, 1996; Übersichtsartikel Albright und Tijan, 2000; Werten et al., 2002; Walker und Blackwell, 2003). Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass TBP eine sattelförmige Struktur besitzt und an der TATA-Box die kleine Furche („minor groove“) der DNA bindet (Kim et al., 1993), die dadurch gebeugt und teilweise entwunden wird. Abb. 2 zeigt schematisch den Ablauf der TFIID-vermittelten Transkriptionsinitiation. Durch „cross-linking-Experimente“ wurde gezeigt, dass TFIID zusammen mit TFIIA nur in Anwesenheit von Aktivatoren an die DNA bindet, die wiederum erst durch intra- oder extrazelluläre Signale über Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden (Kuras und Struhl, 1999; Li et al., 1999; Übersichtsartikel Pugh, 2000).

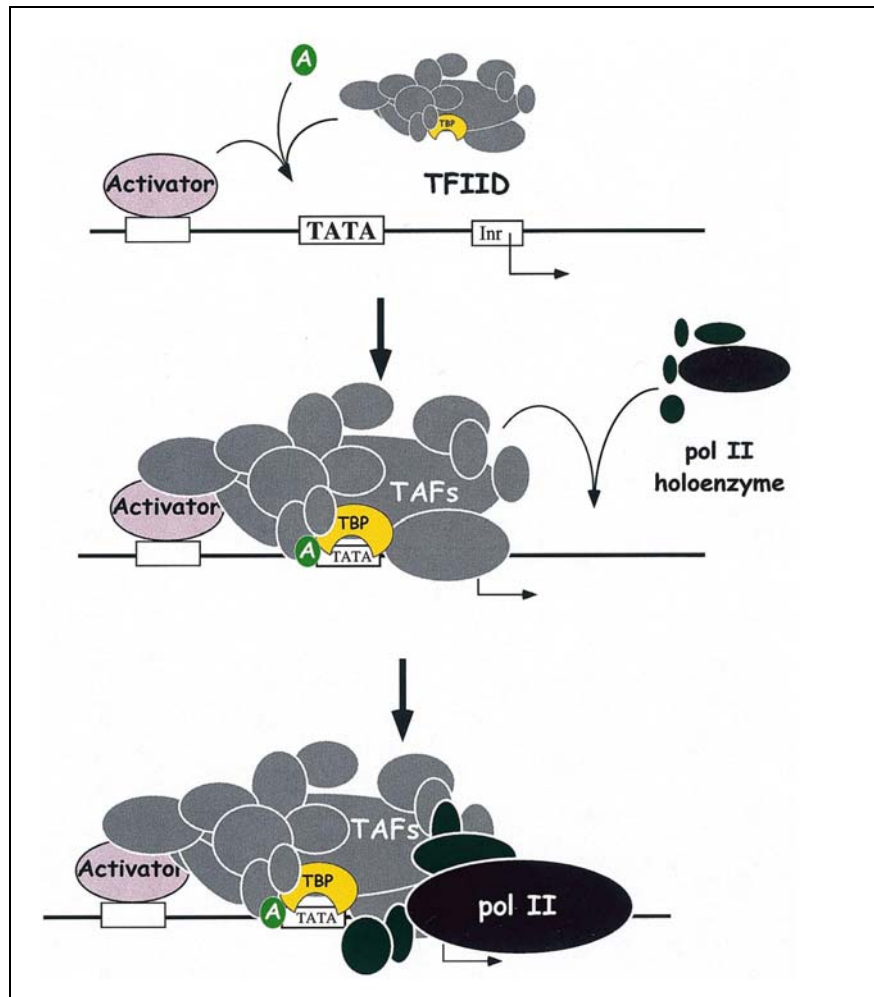


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivator-vermittelten TFIIA (A)-, TFIID- und RNAP II (pol II)-Anlagerungen beim Zusammenbau des Transkriptionskomplexes (aus Pugh, 2000).

Die DNA-Bindung erfolgt über den C-terminalen Bereich von TBP, der innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert ist, und beispielsweise eine 80%ige Homologie der Aminosäuresequenz zwischen Hefe und Mensch aufweist. Der N-terminale Bereich des 36 bis 38 kDa großen TBP ist dagegen zwischen verschiedenen Spezies variabel und seine genauen Funktionen sind bisher nicht exakt geklärt. Es wurden Wechselwirkungen des N-Terminus von TBP mit anderen Proteinen beschrieben und es wird angenommen, dass er regulatorische Funktionen innehat, die aufgrund der evolutionären Divergenz speziesspezifisch sein könnten (Hernandez, 1993; Lee und Struhl, 2001; Davidson, 2003). Untersuchungen beschreiben, dass das Entfernen des vertebratenspezifischen N-Terminus von TBP, vermutlich aufgrund einer Störung der maternalen Immuntoleranz, zum Tod von Mäuseföten in der Schwangerschaft führt (Hobbs et al., 2002). Primäre Mäusefibroblasten, denen ein Großteil der vertebratenspezifischen N-terminalen TBP-Aminosäuren fehlen, zeigen hingegen keine Wirkungen auf fundamentale zelluläre Prozesse, was den Schluss nahe legt, dass die Funktionen dieser Polypeptid-Domäne durch redundante Aktivitäten kompensiert werden müssen oder auf

Prozesse limitiert sind, die nicht in diesen Zellen vorkommen (Schmidt et al., 2003). Es wird vorgeschlagen, dass der N-Terminus von TBP ursprünglich ein TAF gewesen und über eine kovalente Bindung an den TBP-C-Terminus fusioniert worden sein könnte (Hobbs et al., 2002).

Neben der Bildung von TFIID spielt TBP auch eine entscheidende Rolle für die Transkription durch die anderen RNA-Polymerasen. So setzen sich der Transkriptionsfaktor SL1, der an der Transkription durch die RNAP I beteiligt ist, ebenso wie der für die Transkription durch die RNAP III wichtige Transkriptionsfaktor TFIIB, oder der SNAP-Komplex für die Synthese von snRNAs („small nuclear RNAs“) durch die RNAP II und RNAP III, aus TBP und verschiedenen Kombinationen der TAFs zusammen (Übersichtsartikel Hernandez, 1993; Pugh, 2000).

4.1. Die Bedeutung von TBP für die Genexpression

Im Gegensatz zur Struktur von TBP und zur Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes ist weitaus weniger über zelluläre Ereignisse bekannt, die an der Regulation der Transkription des *tbp*-Gens oder an der TBP-Proteinstabilität beteiligt sind.

Es konnten steuernde Wirkungen auf TBP durch Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Phosphoryliertes TBP scheint eine regulatorische Funktion während der M-Phase des Zellzyklus inne zu haben (Leresche et al., 1996). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von humanem TBP durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) zu einer Steigerung der Aktivität der RNAP II führt (Chibazakura et al., 1997). Andererseits wurde beobachtet, dass durch Proteinkinase CK2-vermittelte TBP-Phosphorylierungen in Hefe-Zellen die TBP-Bindungsaffinität zur TATA-Box verringert wird (Maldonado und Allende, 1999).

Bisher sind nur wenige Hinweise hinsichtlich der TBP-Stabilität bekannt. Es wurden relativ stabile TBP-Dimere nachgewiesen, bei denen die DNA-Bindedomäne der beiden TBP-Monomere maskiert ist. Dies könnte möglicherweise einen Schutzmechanismus vor der Degradation des Proteins oder eine Autorepression der DNA-bindenden Eigenschaften darstellen (Coleman et al., 1995; Geisberg und Struhl, 2000). In embryonalen Mäusekarzinomzellen (F9-Zellen) ist gezeigt worden, dass TBP möglicherweise durch spezifische Proteolyse in Proteasomen inaktiviert wird. Dabei könnte die Differenzierung von F9-Zellen auf der selektiven Proteolyse von TBP und TAF4 beruhen (Perletti et al., 2001).

Der Abbau der meisten zellulären Proteine findet im Cytosol über das Ubiquitin-Proteasom-System statt, bei dem es sich im Gegensatz zum lysosomalen Proteinabbau um einen selektiven Abbaumechanismus handelt (Übersichtsartikel Hochstrasser, 1996).

Ubiquitin ist ein kleines Protein aus 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 8,5 kDa. Es ist das am stärksten konservierte Protein in Eukaryoten. Zur Markierung von abzubauenden Proteinen wird der C-Terminus von Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 gebunden, woraufhin Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 transferiert wird. Die Ubiquitin-Protein-Ligase E3 (E3-Ligase) ist für den entscheidenden Schritt der Substraterkennung verantwortlich und katalysiert schließlich die Übertragung des Ubiquitins auf einen Lysin- oder N-terminalen Rest des Zielproteins (Breitschopf et al., 1998; Reinstein et al., 2000). Erst eine Kette von mindestens vier Ubiquitin-Monomeren gilt als Abbausignal des Proteins über das Proteasom, wobei eine Multi-Ubiquitinkette eine Erhöhung der Affinität des Substrates an das Proteasom bewirkt (Übersichtsartikel DeMartino und Slaughter, 1999; Thrower et al., 2000). Die polyubiquitinierten Proteine werden in einem großen, aus zwei Untereinheiten bestehenden Protease-Komplex, dem 26S-Proteasom, ATP-abhängig abgebaut (Übersichtsartikel DeMartino und Slaughter, 1999) (Abb. 3).

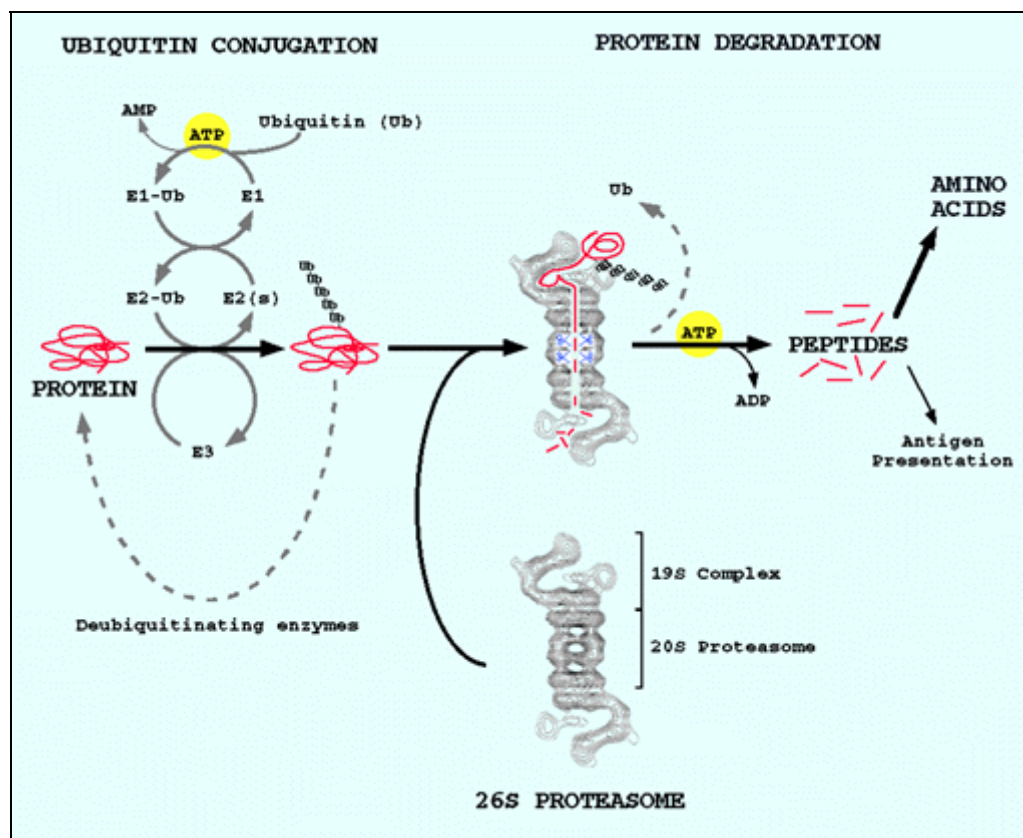


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus (von A. Goldberg)

Nicht alle ubiquitinierten Proteine werden abgebaut. So stellt eine Einfach-Ubiquitinierung von Histonen eine reversible Modifizierung dar, die eine Auflockerung des Chromatins zur Folge haben könnte (Übersichtsartikel Hicke, 2001).

Viele Transkriptionsfaktoren können durch das proteolytische Ubiquitin-Proteasom-System eliminiert werden. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Stärke eines Aktivators und dessen Stabilität beobachtet. Je potenter ein Transkriptionsfaktor ist, desto instabiler scheint er zu sein („unstable when active“-Modell von Thomas und Tyers, 2000). Gleichzeitig gibt es Hinweise, dass Aktivierungsdomänen und spezifische Degradationsbereiche (Degrons) in unmittelbarer Nachbarschaft liegen können. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Ubiquitinierung eines Transkriptionsfaktors zunächst zu seiner Aktivierung führt und anschließend ein Signal für den proteasomalen Abbauweg darstellt (Salghetti et al., 2001). Bekannte Aktivierungsdomänen von Proteinen sind gekennzeichnet durch prolinreiche und glutaminreiche Bereiche (Gerber et al., 1994). Ob die glutaminreiche Domäne von TBP ein Ziel der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse sein könnte, und welche Auswirkungen eine mögliche Ubiquitinierung von TBP hätte, ist bislang ungeklärt.

In zellulären Prozessen ist TBP zumeist auf die Wechselwirkung mit anderen Faktoren angewiesen, um seine Funktionen ausüben zu können. Erst die Interaktion mit einer Vielzahl von Faktoren ermöglicht die korrekte Bindung des basalen Transkriptionskomplexes an die Initiationsstelle des Promotors (Cox et al., 1997). Die Transkription TATA-Box-freier Promotoren mit Beteiligung von TBP macht deutlich, dass neben der hochspezifischen Bindung der TATA-Box auch die Rekrutierung weiterer Faktoren eine wichtige Funktion von TBP ist (Übersichtsartikel Hernandez, 1993; Pugh, 2000). TATA-Box-freie Promotoren sind bei Genen, die durch die RNAP I oder III transkribiert werden oder bei Haushaltsgenen zu finden. Die Transkriptionsinitiation für die RNAP II erfolgt bei Haushaltsgenen über die Interaktion des TAF1/TAF2-Komplexes bzw. TFIID mit dem Initiatorelement des Promotors (Roy et al., 1993; Verrijzer et al., 1995; Chalkley und Verrijzer, 1999). Beim Vorhandensein von GC-Boxen im Promotor interagiert TFIID über TAF4 mit SP1, welches an die GC-Boxen bindet (Gill et al., 1994). In beiden Fällen ist TBP am Aufbau des Initiationskomplexes beteiligt.

Lange wurde angenommen, dass TBP essentiell für die Transkription ist. Inzwischen weiß man, dass die Essentialität von TBP für die Transkription in Eukaryoten differentiell für das jeweils untersuchte System betrachtet werden muss. Untersuchungen in Mäusen haben gezeigt, dass die Inaktivierung von TBP zu einem Wachstumsstop und zu Apoptose im embryonalen Blastozystenstadium führt. Nach dem Verlust von TBP ist die Transkription

durch die RNAP I und RNAP III blockiert, wohingegen die RNAP II in einem transkriptionell aktiven Phosphorylierungszustand bleibt und ein hohes Maß an transkriptioneller Aktivität aufweist. Damit wird eine differentielle Abhängigkeit der RNA-Polymerasen von TBP aufgezeigt, und es gibt Hinweise auf einen TBP-unabhängigen transkriptionellen Mechanismus der RNAP II, der eine Reinitiation und Erhaltung der Genexpression *in vivo* erlaubt (Martianov et al., 2002). Während die Initiation der Transkription die komplette Transkriptionsmaschinerie benötigt, geschieht die Reinitiation wahrscheinlich auf eine andere Weise (Hahn, 1998). Nach der Initiation verbleibt ein Teil der Transkriptionsfaktoren am Promotor und formt eine Plattform für den Zusammenbau des folgenden Transkriptionskomplexes (Zawel et al., 1995). Als Bestandteile des Reinitiationszwischenkomplexes werden TFIID, TFIIA, TFIIF, TFIIH und ein weiterer Mediator beschrieben, die als Gerüst für die Bildung des funktionellen Reinitiationskomplexes dienen können (Yudkovsky et al., 2000). Daher könnte *in vivo* die Reinitiation der Transkription vieler Gene unabhängig von freiem TBP sein. In *in vitro*-Studien ist ein anderer Multiproteinkomplex (TFTC) beschrieben worden, der verschiedene TAFs, aber nicht TBP enthält und eine TBP-freie RNAP II-Transkription vermittelt (Wieczorek et al., 1998).

Eine transkriptionelle Regulation des *tbp*-Gens ist in der späten Spermatogenese in den Hoden von Nagern gezeigt worden, bei der die TBP-Proteinmenge um das 8- bis 11-fache ansteigt (Schmidt und Schibler, 1995). Die Quantität von TBP und vielen TAFs unterscheidet sich generell in verschiedenen Geweben der Maus. Z.B. wird TBP in Hoden und dem Dünndarm stark exprimiert, während im Nervensystem und im Herz nur geringe TBP-Mengen vorliegen (Perletti et al., 1999). Eine Zunahme der TBP-Menge ist in humanen Dickdarm-Karzinomen festgestellt worden, welche vermutlich durch onkogene Signaltransduktionswege entsteht (Johnson et al., 2003). In heterozygoten Hühner-Zellen, die nur eine Kopie des *TBP*-Gens tragen, entsteht ein Phänotyp, der Zellen mit einer verzögerten Mitose ähnelt, wodurch gezeigt wird, dass Veränderungen der TBP-Konzentration deutliche Effekte auf das Zellwachstum in Vertebraten haben können (Um et al., 2001). Untersuchungen haben ergeben, dass sich Zebrafischembryonen nach der Blockierung von TBP oder von TLF („TBP-like factor“), dessen genauere Funktionen bislang noch unbekannt sind, bis zum Midblastulastadium normal entwickeln, jedoch keine Gastrulation durchlaufen. Der differentielle Einfluss von TBP und TLF auf die Genexpression legt jedoch nahe, dass TBP in Vertebraten nicht generell für die RNAP II-Transkription notwendig ist, und dass TBP und TLF differentiell in der frühen Embryogenese erforderlich sein könnten (Müller et al., 2001). Funktionsstörungen von TBP können beim Menschen zu neurodegenerativen Erkrankungen

führen. Das *tbp*-Gen besitzt lange, polymorphe CAG-Triplett-Wiederholungen. Amplifizierte CAG-Wiederholungen resultieren in expandierten Polyglutaminen im aminoterminalen Bereich des humanen TBP. Dadurch entsteht die spinocerebellare Ataxie 17 (SCA 17), die, wie andere neurodegenerative Erkrankungen, zu den Polyglutamin-Erkrankungen zählt (Koide et al., 1999; Fujigasaki et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Zuhlke et al., 2001). Auch zur Alzheimer-Krankheit scheint eine Akkumulation von TBP beizutragen, da unlösliches TBP im Gehirn der Patienten in neurofibrillären Knäuelstrukturen gefunden wurde (Reid et al., 2004).

Für einige Virussysteme wird beschrieben, dass TBP als ein wichtiges Ziel für direkte Interaktionen mit Promotor-spezifischen viralen Aktivatoren wie dem E1A-Protein von Adenoviren, IE2 von Cytomegalieviren oder dem E7-Protein des humanen Papillomvirus Typ 16 fungiert (Lee et al., 1991; Geisberg et al., 1995; Phillips und Vousden, 1997; Kim et al., 2000). Ein direkter Einfluss eines viralen Faktors auf die Menge des TBP-Proteins ist für das Hepatitis B Virus X-Protein gezeigt worden. In diesen Studien ist eine Zunahme von TBP in Abhängigkeit des Ras/Raf-1-Signaltransduktionsweges beobachtet worden, wodurch die RNAP III-Transkriptionsrate in den Zellen ansteigt (Wang et al., 1995, 1997). Für das HSV-1-Protein VP16 sind Wechselwirkungen mit TFIID bekannt (Stringer et al., 1990; Goodrich et al., 1993). In *in vitro*-Analysen geht gereinigtes HSV-1 ICP4 Komplexe mit TFIID über TBP oder TAF1 ein, wodurch die ICP4-aktivierte Transkription unterstützt werden könnte (Smith et al., 1993; Carrozza und DeLuca, 1996).

Es wird angenommen, dass in Baculovirus-infizierten Zellen die Bindung von TBP an Promotoren der sehr frühen Gene eines der ersten Ereignisse der Infektion ist. Des Weiteren gilt TBP als Kandidat für direkte Interaktionen mit baculoviralen Transaktivatoren wie IE1, und könnte dadurch an der Transkription der frühen viralen Gene eine Rolle spielen (Rasmussen und Rohrmann, 1994). Bisher ist jedoch kein Nachweis für eine Funktion von TBP bei der frühen Genexpression erbracht worden. Eine Beteiligung von TBP an der Transkription der späten und sehr späten Baculovirusgene ist bisher nicht untersucht worden.

4.2. Funktionen der TAFs im Transkriptionsfaktor TFIID

Erst die Interaktion von TBP mit den zuvor bereits erwähnten TAFs ermöglicht eine fein regulierbare Transkription aktiver Gene, da TBP alleine nicht in der Lage ist die basale Transkriptionsaktivität deutlich zu erhöhen (Übersichtsartikel Pugh und Tjian, 1991). TAFs konnten aus verschiedensten Organismen isoliert und identifiziert werden, und wurden nach

ihrer elektrischen Mobilität im Polyacrylamidgel benannt. Um Konfusionen beispielsweise im Hinblick auf ihre Funktionen zu vermeiden, wurde kürzlich eine einheitliche Nomenklatur eingeführt (Tora, 2002), die in dieser Arbeit Verwendung findet. Die Hauptfunktionen der TAFs liegen in der Interaktion mit dem Promotor und mit anderen Transkriptionsfaktoren, sowie in der Aktivität als Koaktivatoren der Transkription (Übersichtsartikel Albright und Tjian, 2000; Verrijzer und Tjian, 1996). Die Abb. 4 zeigt exemplarisch die Zusammensetzung der vorgeschlagenen Struktur von *Drosophila* TFIID.

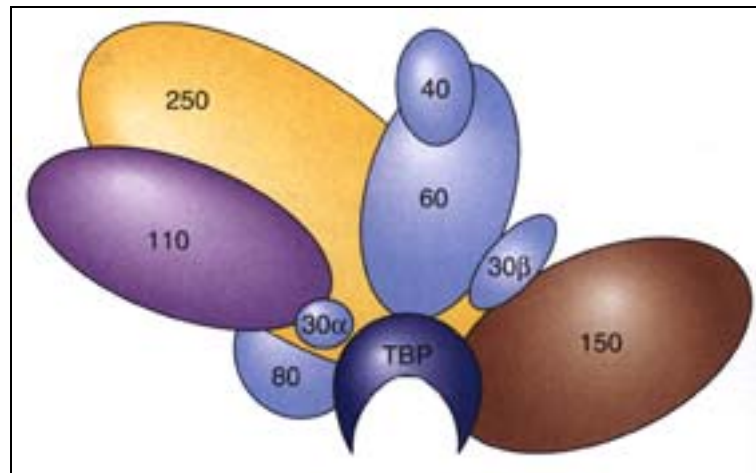


Abb. 4: Schematische Darstellung der angenommenen Struktur von *Drosophila* TFIID

Darstellung mit den alten Bezeichnung der TAFs (TAF_{II}250 = TAF1, TAF_{II}150 = TAF2, TAF_{II}110 = TAF4, TAF_{II}80 = TAF5, TAF_{II}60 = TAF6, TAF_{II}40 = TAF9, TAF_{II}30β = TAF11, TAF_{II}30α = TAF12) (aus Weaver, 2000).

Die größte und am besten studierte Untereinheit von TFIID ist TAF1. TAF1 bindet direkt an TBP und bildet ein Gerüst, an das sich die anderen TAFs bei der Zusammensetzung des Initiationskomplexes anlagern. TAF1 besitzt Proteinkinase- sowie Histonacetyltransferaseaktivitäten (Dikstein et al., 1996; Mizzen et al., 1996). Die Acetylierung von Histonen ist entscheidend an der transkriptionellen Aktivierung von Genen beteiligt (Braunstein et al., 1993; Lee et al., 1993). Zudem besitzt TAF1 eine geringe Substratspezifität, die es in die Lage versetzt auch andere Proteine zu modifizieren (Dunphy et al., 2000). Die Acetylierung der Transkriptionsfaktoren TFIIEβ und TFIIF sind beschrieben, jedoch die Auswirkung auf zelluläre Prozesse nicht aufgeklärt worden (Imhof et al., 1997). Die Phosphorylierung von TFIIA durch TAF1 bewirkt einen stabilisierenden Effekt auf die TFIIA-TBP-Bindung bei der Transkriptionsinitiation (Solow et al., 2001). Durch seine Kinaseaktivität kann TAF1 außerdem sich selbst und TFIIF phosphorylieren (O'Brien und Tjian, 1998). Des Weiteren konnten für TAF1 Ubiquitin-aktivierende und -konjugierende Eigenschaften (z.B. an das Histon H1) nachgewiesen werden (Pham und Sauer, 2000; Übersichtsartikel Wassarman und Sauer, 2001).

TAF4 bindet durch seine glutaminreiche Region Q1 bis Q4 direkt an den transkriptionellen Aktivator Sp1 und vermittelt so die Bindung von TFIID an GC-Boxen in TATA-losen Promotoren (Tanese et al., 1996; Saluja et al., 1998). In Gehirnen von humanen Huntington-Patienten ist die Sp1-TAF4-Wechselwirkung interessanterweise reduziert (Dunah et al. 2002). TAF4 fungiert in Säugerzellen ebenfalls als spezifischer Koaktivator für eine Reihe nukleärer Rezeptoren (Mengus et al., 1997). Durch eine Interaktion mit dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1) konnten auch Wirkungen als transkriptioneller Repressor nachgewiesen werden (Vassallo und Tanese, 2002).

Drosophila melanogaster TAF5 (dmTAF5) bindet nicht direkt an TBP, sondern in einem Komplex mit anderen dmTAFs, wie TAF1, TAF4 und TAF6 (Dynlacht et al., 1993). Für das humane TAF5 (hsTAF5) ist gezeigt, dass es stark mit den TAFs 1, 7 und 11, etwas schwächer mit den TAFs 12 und 13 und des Weiteren mit TFIIF interagiert, und somit die Bildung des Präinitiationskomplexes unterstützt (Dubrovskaya et al., 1996). Nachfolgende Studien berichten, dass hsTAF5 starke Bindungen mit TAF6 und TAF9 und schwächere mit TBP und den hsTAFs 1, 11 und 12 eingeht, jedoch in diesen Studien nicht mit TAF7 interagiert, weshalb eine Rolle von TAF5 für die Stabilisierung von TAFs-Interaktionen in TFIID vorgeschlagen ist (Tao et al., 1997). RNA-Interferenz-Studien in *Caenorhabditis elegans*-Embryonen zeigen, dass TAF5 an der Transkription einiger Gene beteiligt ist, jedoch für die Expression vieler Entwicklungsgene nicht entscheidend ist (Walker und Blackwell, 2003).

Für TAF7 ist gezeigt, dass es die Funktionen vieler anderer Transkriptionsaktivatoren durch direkte Interaktionen vermitteln kann (Chiang und Roeder, 1995). Es spielt z.B. eine Rolle bei der Transkriptionsregulation durch c-Jun (Munz et al., 2003). Des Weiteren interagiert es mit anderen Transkriptionsfaktoren wie TAF1, TAF5, TAF11, TAF12, TAF13 und Sp1, aber nicht direkt mit TBP (Lavigne et al., 1996).

Für TAF6, TAF9 und TAF12 sind Homologien zu den Histonen H4, H3 und H2B nachgewiesen. Unter kristallinen Bedingungen kann zudem die Ausbildung von TAF6-TAF9-Tetrameren beobachtet werden (Xie et al., 1996). Somit wird eine Kernstruktur bestehend aus den TAFs 6, 9 und 12 innerhalb von TFIID vorgeschlagen, die einem Histon-Oktamer zur Organisation von genomischer DNA in Nukleosomen ähneln könnte (Hoffmann und Roeder, 1996; Oelgeschläger et al., 1996). TAF12 bildet Heterodimere mit TAF4 aus und formt auf diese Weise Histon-ähnliche Paare im TFIID-Komplex, wobei TAF4 zugleich auch an der Ausbildung eines Oktamer-Komplexes aus TAFs beteiligt sein könnte (Gangloff et al., 2000; Werten et al., 2002). Auch TAF11 und TAF13 bilden Heterodimere aus, vermutlich ebenfalls durch Histon-ähnliche Strukturen und binden dabei an TBP (Mengus et al., 1995;

Birck et al., 1998). Konditionale TAF9-„Knockout“-DT40-Zellen aus Hühnern zeigen den Verlust weiterer TAFs aus TFIID und die Induktion von Apoptose (Chen und Manley, 2000). Dies resultiert aus einer Aufbaustörung des TFIID-Komplexes nach der Entfernung von TAF9, wodurch TAF9 eine Schlüsselrolle im TFIID-Aufbau zuzukommen scheint (Chen und Manley, 2003).

Die meisten publizierten Modelle gehen davon aus, dass jeder TFIID-Komplex aus einem TBP und jeweils einem Molekül eines jeden TAFs aufgebaut ist, wobei die Existenz dieser Stöchiometrie keineswegs bewiesen ist (Albright und Tjian, 2000). Durch das Auftreten von TAF-Dimeren, -Tetrameren und -Oktameren, sowie durch die Beschreibung von TBP-Dimeren ist eine komplexere Zusammenlagerung wahrscheinlich. Die Ähnlichkeiten einiger TAF-Interaktionen mit Histon-Interaktionen lassen Vermutungen zu, dass TAF-Komplexe an der Verschiebung von Nukleosomen oder der Stabilisierung offener DNA-Bereiche am Transkriptionsinitiationsort beteiligt sein könnten (Kokubo et al., 1994).

Es ist eine Reihe von TAF-Interaktionen mit viralen Faktoren beschrieben worden. Faktoren unterschiedlicher Viren sind identifiziert worden, die nach einer Inaktivierung von TAF1 seine Funktionen übernehmen können (Übersichtsartikel Wassarman und Sauer, 2001). Eine Beteiligung von TAF1 an der Repression der MHC I-Expression durch das HIV-1 Tat-Protein ist beschrieben worden (Weissman et al., 1998). TAF1 interagiert darüber hinaus *in vitro* mit dem HSV-1 ICP4-Protein (Carrozza und DeLuca, 1996). Es konnte demonstriert werden, dass die HSV-1-Infektion zu einem Verlust von TFIIE bei der RNAP II-Transkriptionsinitiation, ebenso wie zu einer veränderten Phosphorylierung der RNAP II führen kann, wohingegen TBP und andere generelle Transkriptionsfaktoren in infizierten Zellen nicht beeinflusst werden (Jenkins und Spencer, 2001).

Bisher liegen keine Untersuchungen zu Interaktionen von Insektenzell-TAFs mit viralen Transkriptionsfaktoren während der Baculovirusinfektion vor. Dabei sind sowohl direkte Einflüsse der AcMNPV-Infektion auf TBP, als auch komplexere Regulationsmechanismen des zellulären Transkriptionsapparates über TAFs und TBP durch das Virus denkbar.

5. Zielsetzung der Arbeit

Ein zentraler Schritt der Virus-Wirtszell-Interaktionen ist die Umwandlung der zellulären Genexpression in die Transkription des viralen Genoms. Viren besitzen dafür verschiedene Mechanismen, die entweder die Einbeziehung der zellulären RNA-Polymerase II oder die Einschleusung bzw. die Expression von viruskodierten RNA-Polymerasen beinhalten.

Das zentrale Interesse dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses großer DNA-Viren auf den basalen Transkriptionsapparat der Wirtszellen. Dabei standen Analysen zur Expression und zur Lokalisierung des TATA Binde-Proteins (TBP) und von TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) als Untereinheiten des TFIID-Transkriptionsfaktors während des Infektionszyklus von großen DNA-Viren im Vordergrund.

Eine Besonderheit des Infektionszyklus von Baculoviren besteht in der Verwendung von zwei verschiedenen RNA-Polymerasen. Die zelluläre RNA-Polymerase II ist für die Transkription früher viraler Gene zuständig, während die späte Virustranskription durch eine aus viralen Untereinheiten bestehende RNA-Polymerase vermittelt wird. Es wird angenommen, dass TBP an der frühen baculoviralen Transkription beteiligt ist. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es Hinweise für die bislang ungeklärte Rolle von TBP an der späten viralen Transkription gibt. Zunächst wurde die Expression und Lokalisierung von TBP während der Infektion durch das Baculovirus AcMNPV untersucht. Anschließend sollte analysiert werden, inwieweit die TBP-Expression und -Lokalisierung von der viralen Replikation, der Protein-neusynthese und dem Ubiquitin-Proteasom-System abhängig sind.

Um die Bedeutung von TBP während der Virusinfektion anhand der Eliminierung des Faktors untersuchen zu können, sollte die RNA-Interferenztechnik in einer für Baculoviren permissiven Insektenzelllinie etabliert werden. Vergleichend sollte die experimentelle Reduktion der viralen Faktoren IE2, DBP und LEF-4, die an der Transkription und der Replikation der viralen DNA beteiligt sind, untersucht werden.

Neben Analysen des Einflusses der Virusinfektion auf TBP wurden Untersuchungsmöglichkeiten zur Expression von TAFs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen betrachtet.

Schließlich war es ein Ziel dieser Arbeit, vergleichende Analysen der Expression und Lokalisierung von TBP und TAFs in HSV-1-infizierten, primären humanen Zellen anzustellen, um Hinweise zur Allgemeingültigkeit der Regulation der basalen Transkriptionsfaktoren im Infektionsverlauf großer DNA-Viren zu erhalten.

II. Material

1. Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose (Standard, für Agarosegele)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Agarose (SeaPlaque)	FMC, Rockland, USA
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Grünenthal, Stolberg
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, Illinois, USA
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Chloroform	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Citifluor (AF100 und CFPVOH)	Citifluor Ltd., London, UK
Complete TM (Proteinase-Inhibitorcocktail)	Boehringer, Mannheim
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter)	GibcoBRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylen-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Essigsäure	Fischer Scientific, Düsseldorf
Ethanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Calbiochem, Los Angeles, USA
Glucose	Baker Chemicals, Deventer, NL
Glycerin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Glycin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Hoechst-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumacetat	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Kaliumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Manganchlorid 4-Hydrat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Methanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Milchpulver (aus Magermilch)	Glücksklee, München
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat (NaAc)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumhydroxid (NaOH)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Neutralrotlösung	Sigma, Irvine, UK
Nonidet P40 (NP40)	Sigma-Aldrich, Steinheim

PAA ("phosphonoacetic acid")	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	GibcoBRL, Karlsruhe
Phenol	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Baker Chemicals, Deventer, NL
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Steinheim
Tryptose Broth	Difco Laboratories, Detroit, USA
Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen wurden mit über Ionenaustauscher gereinigtem Wasser (Milliporefilteranlage) angesetzt. Wenn möglich, wurden die Lösungen nach der Fertigstellung sterilisiert.

Acrylamid-Lösung	37,5 : 1 30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid in 1 l H ₂ O
Aphidicolin-Stammlösung (1 mg/ml)	1 mg Aphidicolin in 1 ml EtOH (absolut), bei 4°C lagern
BrdU-Medium	50 µM BrdU in TC-100-Medium
BrdU-Stammlösung (6,25 M; Lagerung bei 4°C)	20 mg BrdU-Pulver in 10 ml 40% EtOH
BSA-Lösung (2%)	2 g BSA in 100 ml PBS
Chloroform	gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5
Cycloheximid-Stammlösung (2%)	0,5 g CHX in 25 ml H ₂ O (20 mg/ml), steril filtrieren, bei -20°C lagern
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate	10 mM in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
Dulbecco's Säugerzellkulturmedium(41966-029) (Dulbecco's modified eagle medium)	siehe Katalog der Firma Gibco, BRL
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA in H ₂ O, pH 8,0
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in H ₂ O
Glycin-Lösung	0,1 M Glycin in PBS

Grace`s Insect TC-Medium without hemolymph Kälberserum, fötal (fetal calf serum, FCS) (für Insektenzellkulturen)	siehe Katalog der Firma Gibco, BRL Seromed 068x, Biochrom KG, Berlin
Kälberserum, fötal (fetal calf serum, FCS) (für Säugerzellkulturen)	Serum 842 EE, Biochrom KG, Berlin
L-Agar	L-Broth mit 12,5 g/l Bacto-Agar
L-Broth (LB-Medium)	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast Extract 5 g NaCl pro Liter H ₂ O
Milchpulver-Lösung (5%)	5 g Milchpulver in 100 ml PBS-T
PAA-Stammlösung (100 mg/ml)	500 mg PAA in 5 ml PBS (steril), mit NaOH auf pH 6 titrieren, bei -20°C lagern
Paraformaldehyd-Lösung (2%)	2 g p-Formaldeddyd in 100 ml PBS
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T (für Western Blot-Analysen)	PBS mit 0,1% Tween-20
Phenol	gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5
RF1-Puffer (zur Herstellung kompetenter Bakterien)	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ * 4 H ₂ O 30 mM KAc 10 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 15% Glycerin pH 5,8
RF2-Puffer (zur Herstellung kompetenter Bakterien)	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 15% Glycerin pH 6,8
RIPA-Puffer (zur Zellfraktionierung)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 1% NP40 1 x Complete

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM 250 mM 0,1%	Tris/HCl Glycin SDS
4 x SDS-Probenpuffer (für PAGE)	0,23 M 7,5% 8% 0,004% 0,04 M	Tris/HCl SDS Glycerol Bromphenolblau DTT
Stop-Lösung für Restriktionsendonukleasen (= Ladepuffer für DNA auf Agarosegele)	100 mM 1% 50% 0,1%	EDTA, pH 8,0 SDS Glycerin Bromphenolblau
TAE-Puffer	0,04 M 0,001 M	Tris-Acetat EDTA
TBN-Puffer (zur Zellfraktionierung)	10 mM 140 mM 3 mM 0,5% 1 x	Tris/HCl, pH 6,5 NaCl MgCl ₂ NP40 Complete
TC-100 Insektenzellkultur-Medium	(s. Gardiner und Stockdale 1975)	
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl EDTA, pH 8,0
Tris-Saline	13,7 mM 5 mM 0,3 mM 25 mM 0,1%	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ Tris/HCl, pH 7,4 Glucose
Triton-Lösung zum Permeabilisieren von Zellen	0,1%	Triton-X-100 in PBS
Western-Blot-Puffer	25 mM 192 mM 10%	Tris Glycin Methanol

3. Enzyme

Für die Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden in dieser Arbeit die von den Firmen mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Restriktionsenzyme:

ClaI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
EcoRI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
HindIII	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
NheI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
NotI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
PstI	Boehringer, Mannheim
XhoI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

Andere Enzyme:

DNA-Polymerase (Taq)	Boehringer, Mannheim
RNase A	Promega, Madison, Wisconsin, USA
DNase (RQ1, RNase-frei)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RNA-Polymerase (Enzym-Mix, T7-Express)	Promega, Madison, Wisconsin, USA

4. Plasmide, cDNAs und Primer

4.1. Plasmide und cDNAs

pCMV-DBP	Klonierung siehe Quadt, I., Diplomarbeit, 2000
pCMV-EGFP	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pIE1-hr5-eGFP	Geschenk von P.D. Friesen, University of Wisconsin, Madison, USA
pC1-eGFP	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pSf-TBP	Geschenk von G.F. Rohrmann, Oregon State University, Corvallis, USA
cDNA 125 (IE2)	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
AcMNPV-HindIII-Bibliothek C-Fragment	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf

4.2. Primer

PCR-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen.

Zur Herstellung spezifischer dsRNAs für RNA-Interferenzstudien zur Degradation der mRNAs von eGFP, Sf21-TBP und den AcMNPV-Genen IE2, DBP und LEF-4 wurden folgende Primer verwendet:

eGFP-Primer:

C1-EGFP_1a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3`
C1-EGFP_1b: 5`-GGAGTGGTTGTCGGGCAGCA-3`
C1-EGFP_2a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGAGTGGTTGTCGGGCAGCA-3`
C1-EGFP_2b: 5`-GGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3`

Sf21-TBP-Primer:N-Terminus:

SfTBP_1a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGATGGCGGTGGAGACAGGA-3`

SfTBP_1b: 5`-GGGTAAGTGTGGTACAATGC-3`

SfTBP_2a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGGTAAGTGTGGTACAATGC-3`

SfTBP_2b: 5`-GGATGGCGGTGGAGACAGGA-3`

C-Terminus:

SfTBP_3a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGATTGTCTCCACCGTGAAC-3`

SfTBP_3b: 5`-GGGCTCTTCAATATTGGGTA-3`

SfTBP_4a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGGCTCTTCAATATTGGGTA-3`

SfTBP_4b: 5`-GGATTGTCTCCACCGTGAAC-3`

AcMNPV IE2 (IEN)-Primer:N-Terminus:

AcIEN_1a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGATCGTCAGGGTGTACAGT-3`

AcIEN_1b: 5`-GGCTACATACCCGTGCTTAT-3`

AcIEN_2a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGCTACATACCCGTGCTTAT-3`

AcIEN_2b: 5`-GGATCGTCAGGGTGTACAGT-3`

AcMNPV DBP-Primer:N-Terminus:

DBP_RNAi_1a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGATGGCAACTAAACGCAAG-3`

DBP_RNAi_1b: 5`-GGGCACACGTTTGGTTCCAT-3`

DBP_RNAi_2a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGGCACACGTTTGGTTCCAT-3`

DBP_RNAi_2b: 5`-GGATGGCAACTAAACGCAAG-3`

C-Terminus:

DBP_RNAi_3a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGTTGTATCCCGAGCCCGAT-3`

DBP_RNAi_3b: 5`-GGAATAACAAATATTCCAGG-3`

DBP_RNAi_4a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGAATAACAAATATTCCAGG-3`

DBP_RNAi_4b: 5`-GGTTGTATCCCGAGCCCGAT-3`

AcMNPV LEF-4-Primer:N-Terminus:

LEF-4_RNAi_1a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGGGCGATTTTGTGATTGAG-3`

LEF-4_RNAi_1b: 5`-GGCAAATTCATATTCGAGACG-3`

LEF-4_RNAi_2a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGCAAATTCATATTCGAGACG-3`

LEF-4_RNAi_2b: 5`-GGGGCGATTTTGTGATTGAG-3`

C-Terminus:

LEF-4_RNAi_3a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGGCAGCTAAACGTGATGTG-3`

LEF-4_RNAi_3b: 5`-GGTATCTCAACTCGGTGTCG-3`

LEF-4_RNAi_4a: 5`-GGGTAATACGACTCACTATAGGTATCTCAACTCGGTGTCG-3`

LEF-4_RNAi_4b: 5`-GGGCAGCTAAACGTGATGTG-3`

Die Sequenz des T7-Promotors für nachfolgende *in vitro*-Transkriptionen ist jeweils unterstrichen dargestellt.

5. Zelllinien, Bakterienstämme und Viren

5.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zellen verwendet:

Insektenzelllinie IPLB-Sf21

Diese Insektenzelllinie wurde ursprünglich aus dem Ovarien-Gewebe von verpuppten Larven der Spezies *Spodoptera frugiperda* etabliert (Vaughn et al., 1977). Zellen der 79. Zellkulturpassage wurden von J. Vlak, Universität Wageningen, Niederlande zur Verfügung gestellt.

Insektenzelllinie TN-368

Diese Zelllinie wurde aus zerkleinerten Ovarien von adulten Tieren der Spezies *Trichoplusia ni* etabliert (Hink, 1970). Zellen der 266. Passage wurden von A. Gröner, Höchst AG zur Verfügung gestellt.

Primäre humane Fibroblasten HFFF2

Primäre humane fötale Vorhaut-Fibroblasten (human caucasian foetal foreskin fibroblasts, HFFF2) wurden von ECACC, Salisbury, UK bezogen.

5.2. Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH10B (Hanahan, 1985) wurde von der Firma GibcoBRL, Karlsruhe bezogen.

5.3. Viren

5.3.1. AcMNPV

Das erste Isolat des *Autographa californica* Kernpolyedervirus (AcMNPV) wurde von Vail et al. (1971) beschrieben. Das Plaqueisolat E, mit dem die Experimente in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde von Tjia et al. (1979) aus infektiösem Zellkultur-Medium gereinigt. A. McIntosh, Rutgers University, USA stellte dem Labor dieses Inokulum zur Verfügung.

Die AcMNPV-Rekombinante AcMNPV-CMVeGFP wurde von J. Vlak, Universität Wageningen, Niederlande zur Verfügung gestellt.

Die AcMNPV-Mutanten v-ubi FS und v-ubi RGG wurden von L.A. Guarino, Texas A&M University, Texas, USA zur Verfügung gestellt.

5.3.2. HSV-1

Für alle Experimente mit HSV-1 wurde ein klinisches Wildtyp-Isolat von HSV-1 verwendet. Ein Inokulum von HSV-1 (S17) (McGeoch et al., 1988) wurde von G. Elliot, Marie Curie Research Institute, Surrey, UK zur Verfügung gestellt. Das in dieser Arbeit verwendete HSV-1 (CAV)-Inokulum wurde von M. Schelhaas vermehrt und bereit gestellt.

6. Antiseren, Antikörper und Proteinstandards

6.1. Primäre Antikörper

6.1.1. Primäre Antikörper gegen virale Proteine

IE1-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein IE1 wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt. Das Antiserum wurde 1:5000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

IE2-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein IE2 (Krappa et al., 1995) wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:1000 für die indirekte Immunfluoreszenz und 1:10000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

IE2-Antiserum (aus Maus)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein IE2 wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von A. Rziha, BFA für Viruserkrankungen, Tübingen hergestellt und aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt. Das Antiserum wurde 1:100 für indirekte Immunfluoreszenzstudien verdünnt.

PE38-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein PE38 (Krappa et al., 1995) wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt, und wurde gegen Sf21-Zellen präadsorbiert. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:10000 in Western Blot-Analysen verwendet.

DBP-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das BmNPV-Protein DBP wurde von Keiju Okano, RIKEN, Wako, Saitama, Japan zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:4000 für die indirekte Immunfluoreszenz und 1:10000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

LEF-3-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein LEF-3 wurde von G.F. Rohrmann, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde 1:10000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

LEF-4-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein LEF-4 wurde von L.A. Guarino, Texas A&M University, Texas, USA zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:10000 in Western Blot-Analysen verwendet.

P35-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein P35 wurde von G. Häcker, Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München, München zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde 1:10000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

P10-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV-Protein P10 wurde von M. van Oers, Landbouwniversiteit, Wageningen, NL zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:5000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

P39-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper P10C6 gegen das AcMNPV-Protein P39 wurde von L.E. Volkman, University of California, Berkeley, USA zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde 1:2000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

GP64-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper AcV5 gegen das AcMNPV-Protein GP64 wurde von G.W. Blissard, Boyce Thompson Institute, Cornell University, Ithaca, New York, USA zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 in Western Blot-Analysen verwendet.

ICP4-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum r74 gegen das HSV-1-Protein ICP4 wurde von R. Everett, Medical Research Council/Virology Unit, University of Glasgow, UK zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

6.1.2. Primäre Antikörper gegen zelluläre Proteine**TBP-Antiserum (aus Kaninchen)**

Das polyklonale Antiserum SA3889 gegen die N-terminale Domäne des bakteriell überexprimierten Sf21-TBP-Proteins wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt. Das Antiserum wurde 1:1000 für indirekte Immunfluoreszenzstudien und 1:2000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

TBP-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum SA3890 gegen die N-terminale Domäne des bakteriell überexprimierten Sf21-TBP-Proteins wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:1000 für die indirekte Immunfluoreszenz und 1:2000 in Western Blot-Analysen verwendet.

dTBP-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 58C9 gegen die hoch konservierte, C-terminale Domäne des TBP-Proteins aus *Drosophila melanogaster* wurde von R. Weinzierl und R. Tjian, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

hTBP-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum sc-204 gegen das humane TBP-Protein wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg bezogen. Das Antiserum wurde 1:1000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

hTBP-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 3G3 gegen das humane TBP-Protein wurde von I. Davidson, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz und 1:5000 in Western Blot-Analysen verwendet.

RNAP II-CTD-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 7C2 gegen die CTD der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II wurde von M. Vigneron, Ecole Superieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde 1:10000 für indirekte Immunfluoreszenzstudien verdünnt.

hsTAF1-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper sc-735 gegen das humane TAF1-Protein wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz und 1:500 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

hsTAF4-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 32TA gegen das humane TAF4-Protein wurde von I. Davidson, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde 1:2000 für indirekte Immunfluoreszenzstudien und 1:10000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

hsTAF5-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das humane TAF5-Protein wurde von T. Oelgeschläger, Marie Curie Research Institute, Oxted, Surrey, UK zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde 1:10000 in Western Blot-Analysen verwendet.

hsTAF7-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 19TA gegen das humane TAF7-Protein wurde von I. Davidson, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:5000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

hsTAF12-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 22TA gegen das humane TAF12-Protein wurde von I. Davidson, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde 1:5000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

hsTAF13-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper 16TA gegen das humane TAF13-Protein wurde von I. Davidson, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Illkirch Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 in Western Blot-Analysen verwendet.

dmTAF9-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das *Drosophila melanogaster* TAF9-Protein wurde von S. Georgieva, Institute of Gene Biology RAS, Moskau, Russland zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde 1:2000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

dmTAF5 „a“-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum „a“ gegen das *Drosophila melanogaster* TAF5-Protein wurde von J. Sawada und Y. Nakatani, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:1000 in Western Blot-Analysen eingesetzt.

dmTAF5 „III“-Antiserum (aus Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum „III“ gegen das *Drosophila melanogaster* TAF5-Protein wurde von Y. Nakatani, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde 1:1000 für Western Blot-Analysen verdünnt.

Ubiquitin-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper FK2, der spezifisch gegen konjugiertes Ubiquitin gerichtet ist, wurde von der Firma Affinity Research Products Ltd., Exeter, UK bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50000 für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

BrdU-Antikörper (aus Maus)

Der monoklonale Antikörper B44 gegen das Nukleotid-Analogon BrdU wurde von der Firma Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 (Stammlösung 25 µg/ml) für indirekte Immunfluoreszenzstudien eingesetzt.

6.2. Sekundäre Antikörper

Der Alexa Fluor (AF) 488-gekoppelte anti-Kaninchen-Antikörper des Typs IgG aus Ziegen wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL bezogen. Der Antikörper wurde 1:2000 (Stammlösung 2 mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF488-gekoppelte anti-Maus-Antikörper des Typs IgG aus Ziegen wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL bezogen. Der Antikörper wurde 1:2000 (Stammlösung 2 mg/ml) für indirekte Immunfluoreszenzstudien verdünnt.

Der AF555-gekoppelte anti-Maus-Antikörper des Typs IgG aus Ziegen wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL bezogen. Der Antikörper wurde 1:2000 (Stammlösung 2 mg/ml) in indirekten Immunfluoreszenzstudien verwendet.

Der HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte anti-Kaninchen-Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Eseln wurde von der Firma Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK bezogen und 1:4000 in Western Blot-Studien verdünnt.

Der HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte anti-Maus-Antikörper des Typs IgG aus Schafen wurde von der Firma Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK bezogen und 1:2000 in Western Blot-Studien eingesetzt.

6.3. Fluorochrom-gekoppeltes Phalloidin

TRITC-gekoppeltes Phalloidin aus dem Pilz *Amanita phalloides* wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen. Es wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stammlösung 0,2 mg/ml in Methanol) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

6.4. Proteinstandard

Precision Plus ProteinTM Standard
Dual Color

BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

7. Computer und Software

Hardware:

DDS PC-Systeme
Medion, Notebook, Intel Pentium M, 1,6 Ghz
Scanner UMAX PowerLook III

Software:

Microsoft Windows 2000 und XP
Microsoft Office 2000, 2003 und XP
Adobe Photoshop 7.0 und CS
LCS Software (Leica Mikrosysteme)
Focus Control 400 (Intas)
Image J (Quantifizierungssoftware)
siRNA Target Designer (Promega)

Die digitalen mikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung von Focus Control 400 oder LCS Software aufgenommen. Ihre Bearbeitung und Zusammensetzung erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0 oder CS.

8. Geräte und sonstiges Material

Bakterienschüttler (Orbital shaker)

Farma Scientific, Life Sciences International, Frankfurt

Cryo-Röhrchen

Greiner, Solingen

Deckgläser (20 x 20 mm)

Menzel, Braunschweig

Digitalkamerasystem Focus 400

Intas, Göttingen

Durchlichtmikroskop

Leitz, Wetzlar

Elektroblotter (Mini Trans-Blot-Zelle)

BioRad, München

Entwicklermaschine (Curix 60)

AGFA, Köln

Geldokumentationsgerät

Pharmacia Biotech, Cambridge, UK

Gelkammer (für Polyacrylamidgele)

Hoefer Scientific, San Francisco, USA

Gewebekulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm², 75 cm² mit Gasaustauschkappe)

Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK

Gewebekulturplatten (6 und 24 Loch)

Falcon, New Jersey, USA

Gewebekulturschalen (60 x 15 mm)

Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK

Hamilton-Spritze

Hamilton, Reno, USA

Handschuhe (Nitril)

Roth, Karlsruhe

Heizblock (Digi-Block)

neoLab, Heidelberg

Immunfluoreszenzmikroskope: Axiovert 135

Zeiss, Jena

Inkubatoren:

Für Bakterien
Für Insektenzellkulturen
Für Säugerzellkulturen

Kanülen (20 G, 26 G)

„KITS“:

ECLTM Detektions-Kit
Plasmid-Maxi-Kit
T7 RiboMaxTM Express RNAi System
Transfektionspuffer A+B Set

Konfokales Immunfluoreszenzmikroskop
(DM IRBE Mikroskop mit TCS-SP/2-Einheit)

Küvetten (1,5 ml)

Magnetrührer

Minicycler PTC-150 (für PCR)

Nagellack (zum „Versiegeln“ der Deckgläser)

Nitrozellulosemembran (Hybond ECL)

Objektträger (76 x 26 mm)

Parafilm „M“

Petrischalen

pH-Meter

Photometer: Novaspec II
GeneQuant

Pinzetten

Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)

Power supply ESPS 3500
GPS 200/400

PVDF-Membran

Quarzküvetten

Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)

Röntgenfilme

Skalpelle

Spritzen

Sterilbank

Sterilfilter-Einmalfilter

(0,2 µm und 0,45 µm Porengröße)

Sterilfilter (Nalgene Disposable Filterware)

UV-Lampe

Vortex

Wasserbäder

Weißkappröhrchen (12 ml PPN-Röhrchen)

„Whatman“-Filterpapier

Wipptisch (Mini Rocking Platform)

Zählkammern (Neubauer)

Zentrifugen: EBA 12 R

Medifuge

Super T 21

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Heraeus, Hanau

WTB Binder, Tuttlingen

WTB Binder, Tuttlingen

Becton Dickinson, Drogheda, Irland

Amersham, Buckinghamshire, UK

QIAGEN, Hilden

Promega, Madison, Wisconsin, USA

BD Pharmingen, San Diego, USA

Leica, Bensheim

Brand, Wertheim

Heidolph, Kelheim

Biozym, Oldendorf

Jade, Düsseldorf

Amersham, Buckinghamshire, UK

Menzel, Braunschweig

American Can Comp., Greenwich, USA

Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK

WTW, Weilheim

Pharmacia Biotech, Cambridge, England

Pharmacia Biotech, Cambridge, England

Millipore, Eschborn

Eppendorf, Hamburg

Pharmacia, Freiburg

Pharmacia, Freiburg

Amersham, Buckinghamshire, UK

Pharmacia, Freiburg

Eppendorf, Hamburg

Kodak, Stuttgart und

Pierce, Rockford, Illinois, USA

Bayha, Tuttlingen

HSW, Tuttlingen

Nunc, Wiesbaden

Schleicher & Schuell, Dassel

Nalgene, Rochester, USA

Herolab, Wiesloch

Bender & Hobein, Zürich

GFL, Burgwedel

Kleef, Bonn

Schleicher & Schuell, Dassel

Biometra, Göttingen

Hoyer-Madaus, Monheim

Hettich, Tuttlingen

Heraeus, Osterode

Sorvall, Bad Homburg

Corning, New York, USA

III. Methoden

1. Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die dafür benötigten Lösungen und Zellkulturmedien wurden auf die entsprechende Inkubationstemperatur der Zellen vorgewärmt. Es wurden Gewebekulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² und 175 cm², sowie autoklavierte Pipetten und Glasgefäße verwendet.

1.1. Kultivierung der Zelllinie TN-368

Die Insektenzelllinie TN-368 (aus *Trichoplusia ni*) wächst teilweise als Suspensionskultur und haftet nur leicht an der Oberfläche von Gewebekulturflaschen. Bei hoher Dichte neigen die Zellen zur Bildung von Zellklumpen. Die Zellen wurden in 25 cm² Gewebekulturflaschen in 10 ml TC-100-Medium (Gardiner und Stockdale, 1975) mit 10% fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) in einem Inkubator bei 27°C vermehrt. Nach zwei bis drei Tagen erfolgte eine 1:6 Verdünnung der Zellen in frischem Kulturmedium.

1.2. Kultivierung der Zelllinie IPLB-Sf21

Die Insektenzelllinie Sf21 (aus *Spodoptera frugiperda*) wurde als Einzelschichtkultur („monolayer“) in Gewebekulturflaschen (75 cm²) kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus 15 ml TC-100 mit 10% FCS, in dem die Zellen bei 27°C vermehrt wurden. Konfluente Zellen wurden durch Klopfen in Suspension gebracht, und ein Drittel oder die Hälfte der Zellen in neue Gewebekulturflaschen überführt, die bereits 10 ml TC-100-Medium enthielten. Nachdem die Zellen nach 10-15 min. adhärent waren, wurde das Medium abgegossen und 15 ml neues TC-100-Medium mit 10% FCS zugegeben. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 27°C war der Zellrasen erneut konfluent.

1.3. Einfrieren und Auftauen von Insektenzellen

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

1.4. Kultivierung von HFFF2-Zellen

Primäre, fötale Vorhaut-Fibroblasten („human foetal foreskin fibroblasts 2“, HFFF2) wurden in Dulbecco's modifiziertem Medium, das zusätzlich 10% FCS und 1% Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, P/S) enthielt, bei 37°C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre in 75 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen in PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen mit einer 0,25%igen Trypsin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die sich in Suspension befindenden HFFF2-Zellen 1:4 in einer neuen Gewebekulturflasche in frischem Zellkulturmedium verdünnt. Nach ca. vier bis fünf Wochen (acht bis zehn Passagen) stellten die Zellen das Wachstum ein.

1.5. Einfrieren und Auftauen von HFFF2-Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% einmal in PBS gewaschen und durch Behandlung mit 0,25%iger Trypsin-Lösung in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium für 1-2 min. bei 1000 x g pelletiert und danach vorsichtig in 1 ml Kulturmedium, das zusätzlich 20% FCS und 4% DMSO enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Cryo-Röhrchen überführt, für einige Tage bei -80°C und anschließend in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Atmosphäre bei -196°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte direkt von -196°C auf 37°C. Die gesamte aufgetaute Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Gewebekulturflasche gegeben, in der 15 ml Zellkulturmedium mit 20% FCS vorgelegt wurden. Nach 1-2 Stunden waren die Zellen adhärent, das Medium wurde zur Entfernung toter Zellen abgenommen und durch frisches Kulturmedium mit 10% FCS ersetzt.

1.6. Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer (Firma Hoyer-Madaus) bestimmt. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, und anschließend ein Tropfen der Suspension an den Rand der Zählkammer gegeben. Durch die Kapillarkräfte wurden die Zellen in die Zählkammer gesaugt. Es wurden 2 x 4 große Quadrate ausgezählt, wobei ein großes Quadrat aus 16 kleineren Quadraten bestand. Da das Gesamtvolumen eines großen Quadrates 0,1 µl beträgt, wurde der Mittelwert der gezählten Zellen in den großen Quadraten

mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Somit ergab sich die Anzahl der Zellen einer Gewebekulturflasche aus folgender Formel:

$$\text{Anzahl der Zellen} = \text{Mittelwert} \times \text{Zellsuspensionsvolumen} \times 10^4$$

1.7. Mykoplasmentest der Zellkulturen

→ Quadts, I., Diplomarbeit, 2000.

2. Arbeiten mit Viren

2.1. AcMNPV-Vermehrung

Acht konfluente 75 cm² Gewebekulturflaschen der Zelllinie Sf21 wurden in acht 175 cm² Gewebekulturflaschen überführt, wodurch diese zu ca. 50% konfluent waren. Die Zellen wurden mit 0,5 pfu („plaque forming units“) pro Zelle eines vorhandenen Inokulums infiziert. Die Infektion erfolgte in einem Volumen von 20 ml TC-100-Medium mit 10% FCS bei 27°C. Nach sechs Tagen befanden sich in den meisten Zellkernen Polyeder, woraufhin das virus-haltige Kulturmedium durch Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C von Zellen und Zelltrümmern getrennt wurde. Der virushaltige Überstand wurde im Anschluss mit Hilfe eines Sterilfilters der Firma Nalgene, der eine Porengröße von 0,45 µm Filter besaß, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.2. Bestimmung der Infektiosität eines AcMNPV-Inokulums („Plaque-Test“)

(Wood, 1977; Brown und Faulkner, 1977; Knudson, 1979; Tjia et al., 1979)

Der Plaque-Test zur Bestimmung der Infektiosität des virushaltigen Kulturmediums wurde in 24-Loch-Platten durchgeführt. Dazu wurden 3×10^5 Sf21-Zellen pro Loch der Platte ausgesät, mit 0,1 ml TC-100-Medium überschichtet und mit 0,1 ml einer Virusverdünnung zwischen 10^{-4} und 10^{-8} angeimpft. Die Virusverdünnung wurde nach einer Adsorption von einer Stunde bei 27°C abgenommen, und die Zellen mit 1 ml eines 1:1 Gemisches aus Sea-Plaque-Agarose und 2 x TC-100 Medium mit 20% FCS und 2% P/S überschichtet. Nach 6 Tagen wurden die lebenden Zellen mit 0,5 ml Neutralrot (0,01% Neutralrot in PBS) angefärbt. Am darauf folgenden Tag konnte anhand der ausgezählten Plaques (Bezirke infizierter, abgestorbener Zellen, die nicht gefärbt wurden) die Infektiosität in pfu/ml errechnet werden:

$$\text{pfu/ml} = \text{Mittelwert (Plaques pro Loch)} \times \text{Verdünnung} \times 10$$

2.3. Infektion von Insektenzellen mit AcMNPV

Zur Präparation von Proteinextrakten aus AcMNPV-infizierten Insektenzellen in 60 mm Gewebekulturplatten wurden 2×10^6 Sf21-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (M.O.I.) von 10 pfu/Zelle, bzw. 6×10^5 TN-368-Zellen mit einer M.O.I. von 20 pfu/Zelle infiziert. Dies bedeutet, dass durchschnittlich zehn bzw. zwanzig infektiöse Virus-Partikel auf eine Zelle kamen. Um eine synchrone Infektion der Zellen zu erreichen, wurde das Inokulum nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde abgenommen und durch TC-100-Medium mit 10% FCS ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Extraktpräparation bei 27°C inkubiert. Der Zeitpunkt der Inokulum-Zugabe wurde als Zeitpunkt 0 h p.i. definiert. Proteinextrakte uninfizierter Zellen wurden immer zusammen mit den frühesten Extrakten der infizierten Zellen hergestellt.

Zur Infektion in RNA-Interferenzstudien wurden 1×10^6 Sf21-Zellen zumeist 20 h p.t. mit einer M.O.I. von 10 pfu/Zelle infiziert. Die Infektion von 1×10^6 Sf21-Zellen mit AcMNPV-CMVeGFP erfolgte ebenfalls bei einer M.O.I. von 10 pfu/Zelle.

Für indirekte Immunfluoreszenzstudien in infizierten Zellen wurden 5×10^4 TN-368-Zellen oder 1×10^5 Sf21-Zellen auf Deckgläsern ausgesät (Abschnitt 9.1.) und mit einer M.O.I. von 20 bzw. 10 pfu/Zelle mit AcMNPV oder v-ubi AcMNPV infiziert. Die Zellen wurden bis zur Fixierung bei 27°C inkubiert. Uninfizierte Insektenzellen wurden zum Zeitpunkt 2 h p.i. oder 4 h p.i. der infizierten Zellen fixiert.

2.4. Vermehrung von HSV-1 CAV („cell-associated virus“) und Bestimmung der Infektiosität (Powell und Watson, 1975)

→ Schelhaas, M., Dissertation, 2003.

Zur Herstellung von Zellextrakten, die bei mock-Infektionen als Negativkontrolle für die HSV-1-Infektion dienten, wurden aus einer 75 cm² Gewebekulturflasche BHK21-Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und für 10 min. bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in PBS resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 1×10^7 BHK21-Zellen pro ml vorlag. Die Zellen wurden aufgebrochen indem sie jeweils dreimal schockgefroren und aufgetaut wurden. Nach einer abermaligen Zentrifugation für 10 min. bei 1000 x g und 4°C wurden die Überstände aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Herstellung von intrazellulärem HSV-1 („cell-associated virus“, CAV) erfolgte durch M. Schelhaas, MPI für neurologische Forschung, Köln. Der Ablauf glich der oben beschriebenen

Herstellung der Negativkontrollen, mit dem Unterschied, dass BHK21-Zellen verwendet wurden, die vier bis fünf Tage zuvor mit HSV-1 bei einer M.O.I. von 0,01 pfu/Zelle infiziert worden waren.

2.5. Infektion von Säugerzellen mit HSV-1

Zur Präparation von Proteinextrakten aus HSV-1 (CAV)-infizierten HFFF2-Zellen in 75 cm² Gewebekulturflaschen wurden 3×10^6 HFFF2-Zellen mit einer M.O.I. von 10 pfu/Zelle infiziert. Um eine synchrone Infektion der Zellen zu erreichen, wurde das Inokulum nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Extraktpräparation bei 37°C inkubiert. Der Zeitpunkt der Inokulum-Zugabe wurde als Zeitpunkt 0 h p.i. definiert. Proteinextrakte uninfizierter Zellen wurden immer zusammen mit den frühesten Extrakten der infizierten Zellen hergestellt.

Für indirekte Immunfluoreszenzstudien in infizierten Zellen wurden 1×10^5 HFFF2-Zellen auf Deckgläsern ausgesät (Abschnitt 9.1.) und die Zellen mit einer M.O.I. von 10 pfu/Zelle infiziert oder mock-infiziert. Mock-infizierte Zellen wurden zum Zeitpunkt 4 oder 6 h p.i. der infizierten Zellen fixiert.

3. Arbeiten mit zellulären Inhibitoren

3.1. Behandlung von Insektenzellen mit Cycloheximid (CHX)

Die zelluläre Translation kann durch das als Ribosomeninhibitor wirkende Antibiotikum Cycloheximid (CHX) aus *S. griseus* gehemmt werden (Helinek et al., 1982). Die Behandlung mit CHX resultiert in einem Zerfall der 18S rRNA und somit in einer Degradation der 40S-Untereinheit der Ribosomen.

Zur Untersuchung der Rolle der Proteinneusynthese für die Expression und Lokalisierung von TBP während der AcMNPV-Infektion, wurden Sf21-Zellen oder TN-368 zu ausgewählten Zeitpunkten des AcMNPV-Infektionszyklus mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml CHX behandelt. Dazu wurde CHX aus einer Stammlösung direkt in das TC-100-Medium pipettiert und die Zellen anschließend weiter bei 27°C inkubiert.

3.2. Inkubation von Insektenzellen mit Aphidicolin

Zur Untersuchung der Abhängigkeit zellulärer oder viraler Prozesse von replizierender DNA kann die DNA-Synthese mit Hilfe des Inhibitors Aphidicolin (aus dem Pilz *Nigrospora sphaerica*), der die DNA-Polymerasen α und δ hemmt, unterdrückt werden (Leonard und Chen, 1984; Hammond et al., 1987). Die Behandlung von Insektenzellen erfolgte 1 h p.i. durch den Austausch des TC-100-Mediums gegen Insektenzellmedium, das 5 $\mu\text{g/ml}$ Aphidicolin enthielt. Anschließend wurden die Zellen bei 27°C inkubiert.

3.3. Behandlung von HFFF2-Zellen mit PAA („Phosphonoacetic acid“)

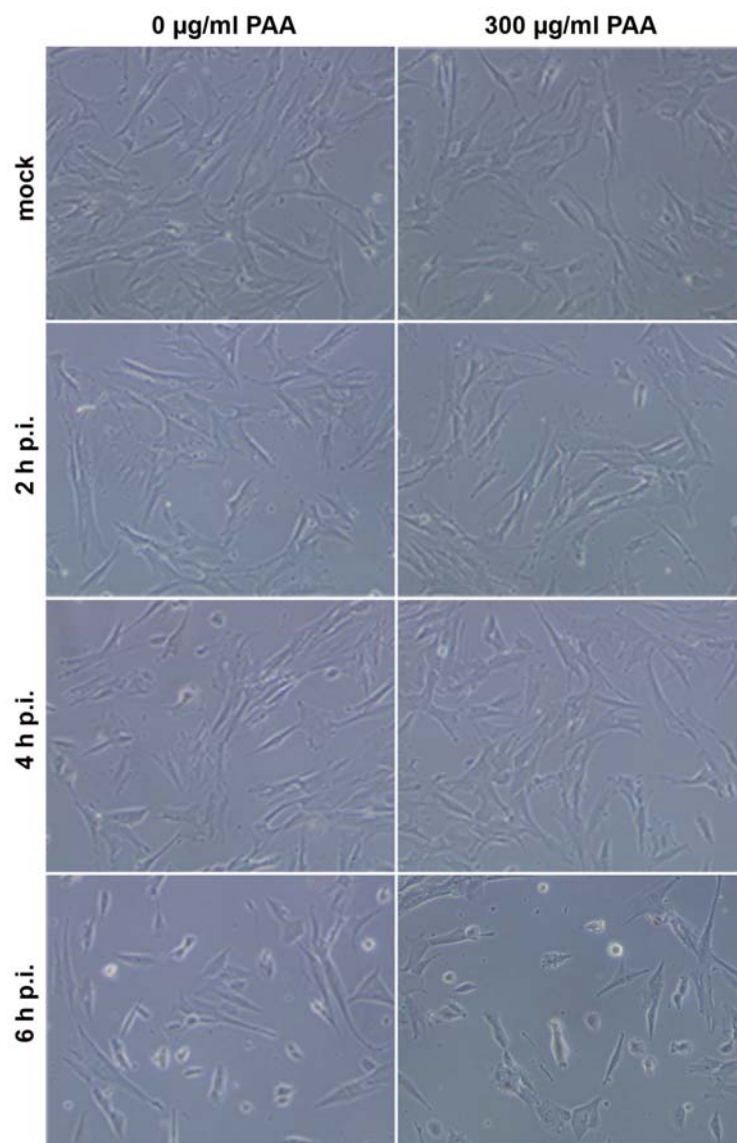


Abb. 5: Einfluss des Virus-Replikationsinhibitors PAA auf die Morphologie von HFFF2-Zellen und auf den HSV-1-induzierten zytopathischen Effekt

Mock-infizierte oder HSV-1-infizierte HFFF2-Zellen wurden 1 h p.i. mit 0 oder 300 $\mu\text{g/ml}$ PAA behandelt. Es sind Phasenkontrast-Aufnahmen 2, 4 und 6 h p.i. dargestellt.

Durch die Inkubation von HSV-1-infizierten Zellen mit dem Virus-DNA-Replikationshemmer PAA („Phosphonoacetic acid“) wird die virale DNA-Synthese inhibiert (Bolden et al., 1975). In dieser Arbeit ergaben die Analysen, dass eine Konzentration von 300 µg/ml PAA eine ausreichende und optimale PAA-Konzentration zur Hemmung der HSV-1-Replikation in HFFF2-Zellen darstellt (Ergebnisteil 6.4.1.), was beschriebenen PAA-Konzentrationen entspricht (Schang et al., 1998). Die Behandlung der Zellen mit PAA erfolgte 1 h p.i. beim Mediumwechsel. Der Einfluss der Wirkung von PAA auf die Morphologie von HFFF2-Zellen wurde durch Phasenkontrastaufnahmen von unbehandelten und mit 300 µg/ml PAA inkubierten HFFF2-Zellen 2 bis 6 h p.i. untersucht (Abb. 5). Es war kein Unterschied der Zellmorphologie unter PAA-Einfluss im Infektionsverlauf auszumachen. Ab 6 h p.i. zeigten auch PAA-behandelte Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE). Es ist bekannt, dass die Ausprägung eines CPE nicht von der Replikation des HSV-1-Genoms abhängt, sondern von der Expression sehr früher HSV-1-Gene (Johnson et al., 1992). Bei der Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts zeigte sich, dass die HFFF2-Zellen durch die Behandlung mit 300 µg/ml PAA keinem großen Zellstress ausgesetzt wurden, da keine Entstehung von PAA-induzierten Stressfibrillen festgestellt werden konnte (Abb. 6).

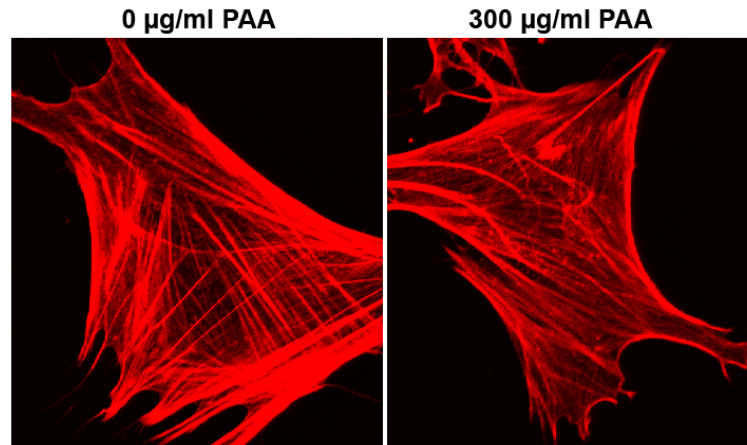


Abb. 6: Untersuchung des Einflusses von PAA auf die Erzeugung von Zellstress in HFFF2-Zellen

Uninfizierte HFFF2-Zellen wurden mit 0 oder 300 µg/ml PAA behandelt und nach 6 Stunden in 2% Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (rot) visualisiert.

4. Arbeiten mit DNA

4.1. Ethanolfällung von DNA

→ Quadts, I., Diplomarbeit, 2000.

4.2. Phenol/Chloroform-Extraktion

→ Quadts, I., Diplomarbeit, 2000.

4.3. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung (Sambrook et al., 1989)

→ Quadts, I., Diplomarbeit, 2000.

4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation kleiner DNA-Fragmente

(Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Dazu werden im ersten Schritt der Reaktion die beiden Stränge der DNA-Matrize durch Erhitzen voneinander getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt, der bei niedrigerer Temperatur erfolgt, binden zwei spezifische Primer an das 5'- und 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (Anlagerung, Annealing). Im dritten Schritt werden die beiden Primer von einer hitzestabilen DNA-Polymerase an der Matrize verlängert. Durch mehrfache Wiederholung der drei Schritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragments, welches zwischen den beiden Primern liegt.

Als Matrize für die DNA-Amplifikation dienten 10 bis 100 ng DNA. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl, in dem H₂O, je 1 µl jeden dNTPs (10 mM), 3 µl Primergemisch (10 pM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x) und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 Einheiten/µl) enthalten war. Die PCR erfolgte in insgesamt 30 Zyklen in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Minicycler. Nachdem die DNA zunächst für 2 min. bei 94°C denaturiert wurde, waren die Reaktionsbedingungen der Zyklen:

Denaturierung der DNA:	30 sec., 94°C
Annealing der Primer:	45 sec., 50°C bis 52°C
Verlängerung der DNA:	60 sec., 72°C

Nach 30 Zyklen wurden unvollständige DNA-Verlängerungen für 7 min. bei 72°C beendet. Danach kühlte die Maschine auf 4°C ab. Anschließend wurden Proben der amplifizierten DNA-Fragmente auf einem Agarosegel kontrolliert.

Mit Hilfe der PCR lassen sich auch einige Basen einer DNA-Sequenz mutieren, wodurch z.B. PCR-Produkte mit T7-Promotor-Sequenzen am 5'-Ende hergestellt werden können. Dazu werden Primer gewählt, die die gewünschte Mutation enthalten. Dieses Prinzip wird als PCR-Mutagenese bezeichnet.

4.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Nathans und Smith, 1975)

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

4.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989)

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

4.7. Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1985)

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

4.8. Hitzeschocktransformation von DNA in kompetente Bakterien

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

4.9. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

(„Maxi-Präparation“, Qiagen)

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

4.10. Sequenzierung von Plasmid-DNA (Sanger et al., 1977)

→ Quadt, I., Diplomarbeit, 2000.

5. Arbeiten mit RNA

5.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Sf21-Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Sf21-Zellen wurden die Zellen in 175 cm² Gewebekulturflaschen mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert. Zu ausgewählten Infektionszeitpunkten wurden die Zellen in Suspension gebracht, 1 min. bei 1000 x g und RT zentrifugiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zellsediment in 8 ml Trizol-Reagenz resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT

erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die RNA wurde in Isopropanol präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und das RNA-Sediment kurz getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert.

5.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Fragmenten

Die Auftrennung von RNA-Fragmenten nach *in vitro*-Transkriptionen für RNAi-Analysen (Abschnitt 6.) erfolgte wie die Auftrennung von DNA-Fragmenten unter Abschnitt 4.6. (Sambrook et al., 1989).

5.3. Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter („Northern Blotting“) (Thomas, 1980)

Der Transfer von RNA aus denaturierenden Agarosegelen auf Nitrozellulosemembranen mit nachfolgendem Nachweis einzelner RNAs durch Hybridisierung von markierten Sonden wird als Northern Blotting-Verfahren bezeichnet.

Zur Überprüfung der Transkription des *tbp*-Gens wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt, für die Gesamt-RNA aus uninfizierten und AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen präpariert wurde. Jeweils 100 µg der RNA wurde auf einem 2,2 M Formaldehyd enthaltenen 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die RNAs wurden mit einer *in vitro* transkribierten RNA-Sonde von 369 nt Länge, die mit Hilfe eines PCR-Fragments synthetisiert worden war, hybridisiert. Das PCR-Fragment wurde mit einem den T7-Promotor tragenden Primer der Sequenz 5'-GGGTAATACGACTCACTA TAGGGCATAGCATTGCGCAAAT-3' hergestellt. Als Matrize in der PCR-Reaktion diente ein mit dem Restriktionsenzym NotI geschnittener cDNA Klon (pSf-TBP) (Rasmussen und Rohrmann 1994).

Die Auftrennung der RNAs, der Transfer auf Nitrozellulosefilter und die Herstellung sowie die Hybridisierung der radioaktiven Sonde für die Northern Blot-Analysen wurden von Irmgard Hölker, MPI für neurologische Forschung, Köln, durchgeführt.

6. RNA-Interferenzanalysen (RNAi)

Die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) wurde als Alternative zu der Herstellung genetischer Mutanten das erste Mal im Nematoden *C. elegans* entdeckt (Fire et al., 1998). Die Technik basiert auf dem Sequenz-spezifischen Ausschalten („silencing“) von Genen als Antwort auf eine doppelsträngige RNA (dsRNA). Wenige dsRNA-Moleküle pro Zelle können ausreichend sein, um die Expression eines Gens mit homologer DNA-Sequenz zu blockieren, weshalb das „silencing“ von Genen durch dsRNA mindestens zehnmal so effektiv ist wie durch die Verwendung von einzelsträngigen RNAs (Fire et al., 1998). Die biologischen Wege, die dem dsRNA-induzierten Gen-„silencing“ zugrunde liegen, stellen einen hoch konservierten Mechanismus dar, der die Genexpression in den meisten eukaryotischen Organismen kontrollieren kann (Übersichtsartikel Hannon, 2002).

6.1. Mechanismus und Verwendung der RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNAi wird durch ein als „Dicer“-Enzym bezeichnetes Mitglied der RNase III Ribonuklease-Familie initiiert, das evolutiv hoch konserviert u.a. in Säugetieren, *C. elegans*, *Arabidopsis*, und in den Insekten *Drosophila* und *Spodoptera frugiperda* identifiziert wurde. Die Dicer-Dimere zerlegen dsRNA in kleine RNA-Duplexe mit einer Länge von 19-25 bp, die als siRNAs („small interfering RNA“) bezeichnet werden. Die siRNAs werden von dem Protein-RNA-Effektor-Nukleasekomplex RISC („RNA-induced silencing complex“) aufgenommen und entwunden. Die Substrat-mRNAs werden durch Basenpaarungen mit dem „antisense“-Strang der siRNA erkannt und endonukleolytisch in der zur siRNA homologen Region gespalten (Übersichtsartikel Hannon, 2002) (Abb. 7 A).

In Säugerzellen beruht effiziente RNAi auf dem Einführen von siRNA, da das Einbringen von dsRNA mit einer größeren Länge als 50 bp die anti-virale Interferon-Antwort aktiviert, wodurch die Gesamtproteinsynthese der Zellen blockiert wird und unspezifische mRNA-Degradationen ausgelöst werden. In Insektenzellen können dagegen lange dsRNA-Moleküle zur spezifischen Degradation von mRNAs eingesetzt werden (Clemens et al., 2000) (Abb. 7 B).

RNAi wurde bisher nicht nur zur Degradation zellulärer RNAs genutzt, sondern ist auch in der Lage die Replikation verschiedener Viren zu unterdrücken (Caplen et al., 2002; Coburn und Cullen, 2002; Übersichtsartikel Dykxhoorn et al., 2003). Studien belegen, dass die

Baculovirusinfektion ebenfalls mit Hilfe spezifischer dsRNAs inhibiert werden kann (Means et al., 2003; Valdes et al., 2003).

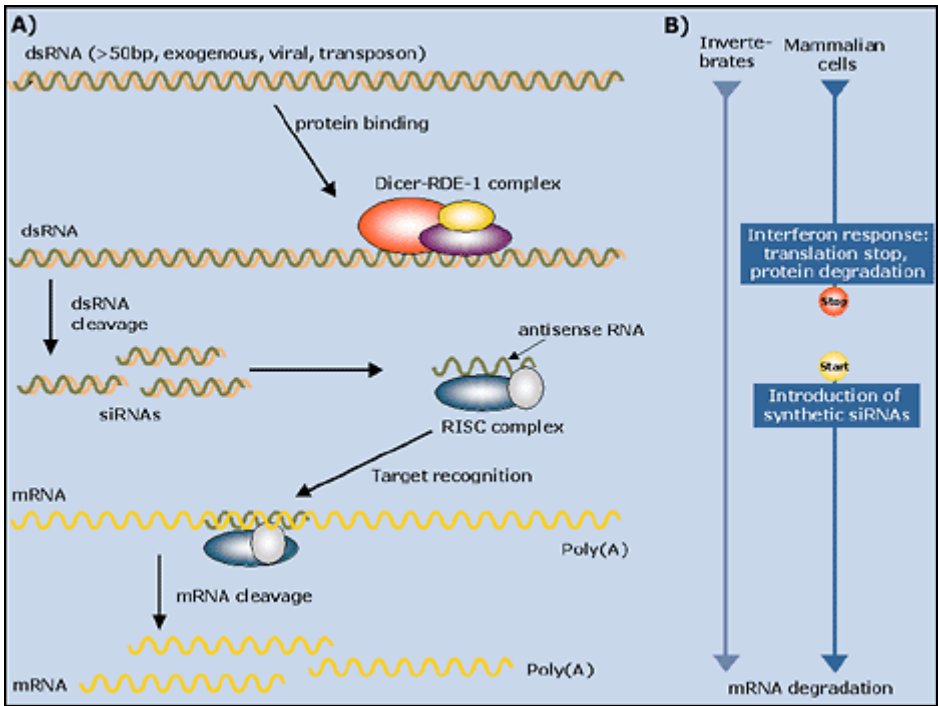


Abb. 7: Mechanismus der RNAi
A) Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus. **B)** Gegenüberstellung des Einbringens von dsRNAs bzw. siRNAs in Invertebratenzellen und Säugerzellen (aus Amaxa, RNAi-Technologie).

6.2. Herstellung spezifischer dsRNAs

Für die Herstellung von dsRNAs der Längen von 500 bis 600 bp zur Degadation der mRNAs von eGFP, Sf21-TBP und den AcMNPV-Genen IE2, DBP und LEF-4 wurde das T7 RiboMax™ Express RNAi System der Firma Promega verwendet. Zunächst wurden DNA-Fragmente mit der PCR-Methode mit Hilfe folgender DNA-Matrizen amplifiziert:

Zur Herstellung von dsRNA	verwendete DNA-Matrize für PCR
GFP	pC1-eGFP
TBP	pSf-TBP
IE2	cDNA 125
DBP	pCMV-DBP
LEF-4	AcMNPV-HindIII-Bibliothek C-Fragment

Die zu amplifizierenden Genbereiche wurden zuvor mit der Software „siRNA Target Designer“ der Firma Promega nach Bereichen mit den potentiell höchsten siRNA-Dichten ausgewählt. Für die maximale Effizienz bei der Herstellung der dsRNAs wurde, wie vom

Hersteller empfohlen, für jeden Strang der DNA-Matrize eine separate *in vitro*-Transkription durchgeführt. Dafür trug jeweils einer der Primer in jeder PCR-Reaktion einen T7-Promotor am 5'-Ende. Von den amplifizierten PCR-Produkten wurde jeweils ca. 1 µg zusammen mit 10 µl Reaktionspuffer (RiboMaxTM Express T7 2x Puffer), 2 µl Enzymmix (T7 Express) und Nuklease-freiem H₂O in einem 20 µl *in vitro*-Transkriptionsansatz für 30 min. bei 37°C eingesetzt. Die beiden synthetisierten komplementären RNA-Stränge wurden anschließend gemischt, 10 min. auf 70°C erhitzt und 20 min. zum Hybridisieren auf RT abgekühlt. Die so entstandenen dsRNAs wurden von verbleibenden einzelsträngigen RNAs und DNA-Matrizen durch RNase A- und DNase-Spaltungen befreit. Dazu wurden 1 µl einer RNase-Lösung, die zuvor 1:200 verdünnt wurde, und 1 µl der RQ1 RNase-freien DNase pro 20 µl Reaktionsansatz zugegeben und der Ansatz bei 37°C für 30 min. inkubiert. Die dsRNAs wurden nach einer Ethanolfällung 15 min. bei RT getrocknet, in H₂O resuspendiert und schließlich bei -80 °C aufbewahrt. Alle Reaktionen erfolgten unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

7. Transfektion von Sf21-Zellen mit Plasmid-DNA oder dsRNAs

Zur Transfektion mit DNA- oder RNA-Calciumphosphat-Präzipitaten wurden 1×10^6 Sf21-Zellen in 2 ml TC-100-Medium pro Loch einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Nach zwei Stunden waren die Zellen adhärent und konnten transfiziert werden.

Die Transfektion erfolgte nach einem Protokoll von Ute Schepers, Universität Bonn, mit dem Transfektionspuffer A+B Set der Firma BD Pharmingen. Dabei wurden zunächst DNA-Plasmide oder dsRNAs in 333 µl Transfektionspuffer B (25 mM HEPES-Puffer, pH 7,1, 125 mM CaCl₂ und 140 mM NaCl) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen verdünnt. Anschließend wurde das Medium von den Sf21-Zellen abgenommen und durch 333 µl Transfektionspuffer A (Grace's Medium mit 10% FCS) ersetzt. Die im Puffer B verdünnten Nukleinsäuren wurden tropfenweise auf die Zellen im Puffer A pipettiert. Dabei wurde die 6-Loch-Gewebekulturplatte zur optimalen Ausbildung der Präzipitate schnell vor und zurück gerüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei RT auf einem Schüttler wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Zellen mit 2 ml 10% FCS enthaltenden TC-100-Medium überschichtet. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 27°C inkubiert.

Test-Transfektionen des DNA-Plasmids pIE1-hr5-eGFP zeigten, dass mindestens 50% der Sf21-Zellen grün leuchteten. Dagegen führte die Behandlung von TN-368-Zellen zu nahezu

keinen grünen Zellen (Abb. 8). Somit wurde deutlich, dass diese Transfektionsmethode für Sf21-Zellen, jedoch nicht für TN-368-Zellen, geeignet ist. Für funktionelle RNAi-Studien im baculoviralen Infektionsverlauf wurden die transfizierten Sf21-Zellen in den meisten Experimenten 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert.

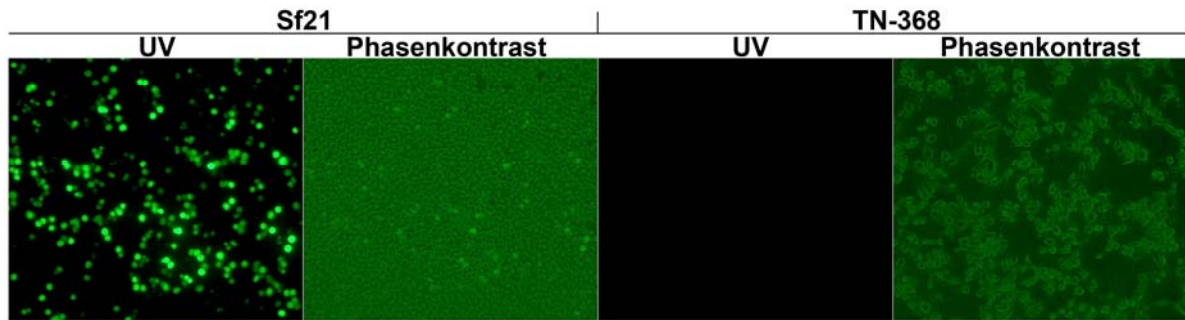


Abb. 8: Test der Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode in Insektenzellen

1×10^6 Sf21-Zellen oder 3×10^5 TN-368-Zellen wurden mit $10 \mu\text{g}$ der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP durch die Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode transfiziert. UV-Licht- und Phasenkontrast-Aufnahmen wurden 24 h p.t. aufgenommen.

8. Arbeiten mit Proteinen

8.1. Präparation von fraktionierten, detergentenbehandelten Proteinextrakten aus Zellkulturen (Detergenzmethode) (Jarvis et al., 1991; Jarvis et al., 1992)

Zur Präparation von Proteinextrakten aus Insektenzellen wurden 2×10^6 Sf21-Zellen bzw. 6×10^5 TN-368-Zellen in 60 mm Gewebekulturplatten ausgesät und über Nacht bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden die Insektenzellen mit AcMNPV infiziert, mit zellulären Inhibitoren inkubiert oder es wurden Extrakte aus unbehandelten Zellen hergestellt. Für die Herstellung von Proteinextrakten in RNA-Interferenzstudien wurden 1×10^6 Sf21-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät und anschließend transfiziert bzw. mit AcMNPV infiziert.

Die Zellen wurden zum Ernten mit einem Gummischaber abgelöst, und 1 min. bei $1000 \times g$ in einem Weißkappröhrchen zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 1 ml Tris-Saline gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und für 1 min. bei $4000 \times g$ und 4°C sedimentiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in $100 \mu\text{l}$ TBN-Puffer resuspendiert, und für 2 min. auf Eis inkubiert. Dadurch wurde die Zellmembran lysiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei $11000 \times g$ und 4°C wurde der Überstand, der die

zytoplasmatische Fraktion darstellte, abgenommen, und auf 0,1 N NaOH eingestellt. Im Sediment befanden sich die Zellkerne, die in 100 µl RIPA-Puffer resuspendiert, und ebenfalls auf 0,1 N NaOH eingestellt wurden. Anschließend wurde die DNA der Kernfraktion zunächst mit einer 20 G Kanüle, und danach mit einer 26 G Kanüle durch mehrmaliges Hochziehen der Lösung in eine 1 ml Spritze geschert. Von den erhaltenen Proben wurden 10 µl für einen BCA-Proteinkonzentrationstest abgenommen, und auf -80°C aufbewahrt. Der Rest wurde mit 16 µl 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer pro 50 µl Aliquot versetzt, und ebenfalls auf -80°C eingefroren.

8.2. Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Zellkulturen

Vor der Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden 3×10^6 HFFF2-Zellen in einer 75 cm² Gewebekulturflasche mit HSV-1 infiziert oder blieben uninfiziert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und durch Behandlung mit einer 0,25%igen Trypsin-Lösung in Suspension gebracht. Nach der Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 x g und RT für 3 min. Das Zellsediment wurde in 2 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min. bei 22000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 60 µl H₂O und zusätzlich 40 µl 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und durch eine fünfminütige Inkubation bei 95°C aufgebrochen. Die erhaltenen Zellextrakte wurden bei -80°C gelagert.

8.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Test)

(Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988)

Proteine bilden mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion), wobei die Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduziert werden und mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex eingehen. Die Reaktion läuft in einem alkalischen Milieu ab, bei dem fast alle Proteine in Lösung bleiben. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm ist proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung und kann photometrisch bestimmt werden. Die absoluten Proteinkonzentrationen werden aus einer Kalibriergeraden extrapoliert, die auf den Messungen einer Verdünnungsreihe mit 0-2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) basiert. Die Proteinproben wurden in Doppelansätzen 1:20 in H₂O verdünnt, mit BCA-Reagenz nach Angaben des Herstellers versetzt und im Anschluss 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurde in einem Photometer die Extinktion bei 562 nm gemessen

und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Kalibriergeraden errechnet (Software: „Microsoft Excel“).

Es wurde die Zellzahl der Insektenzelllinien Sf21 und TN-368 während des AcMNPV-Infektionsverlaufs bestimmt (Abschnitt 1.6.). Es zeigte sich, dass die Zellzahl beider Zelllinien bis 24 h p.i. um ca. 60% anstieg (Abb. 9 A).

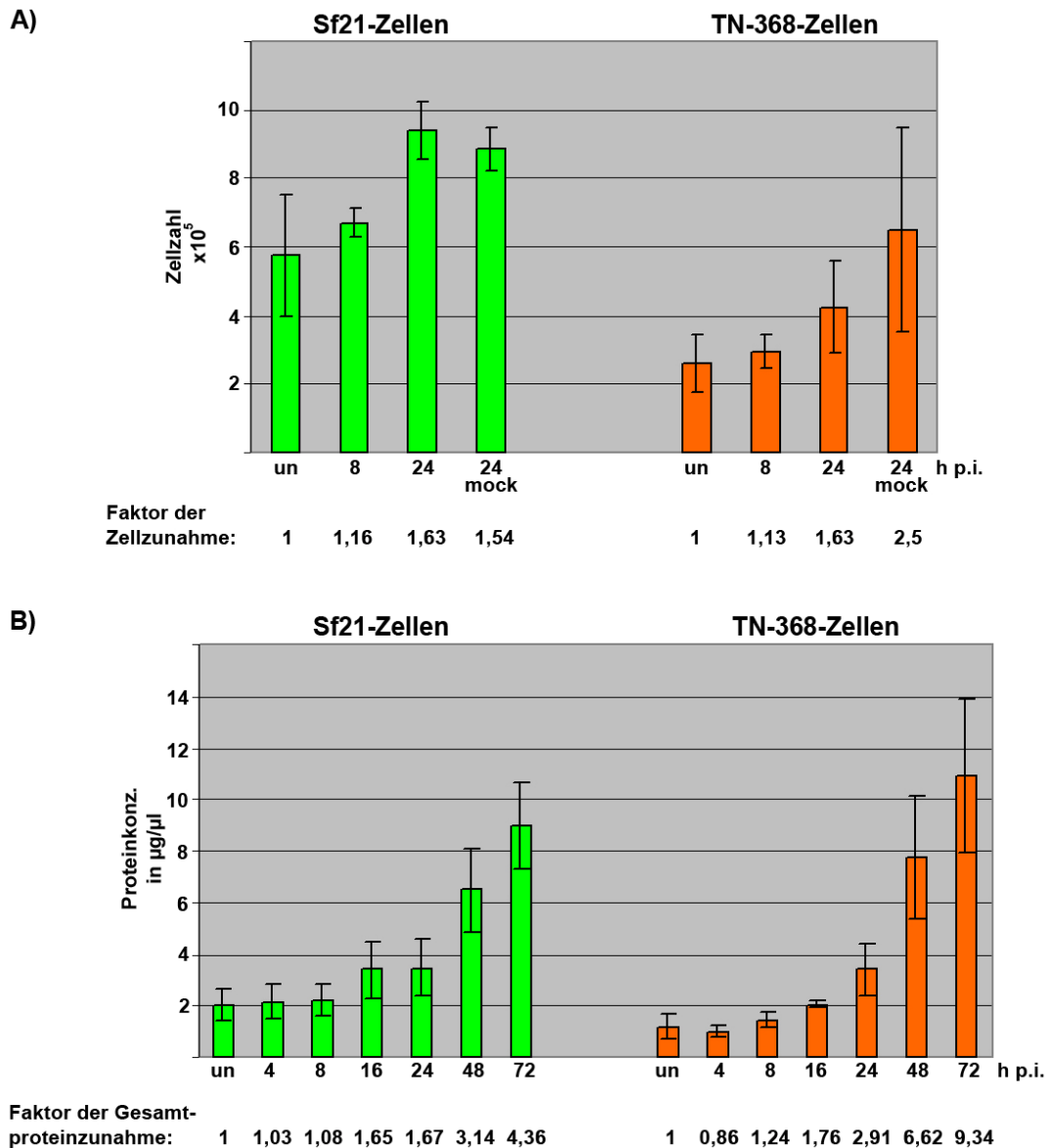


Abb. 9: Bestimmung der Insektenzellzahl und der Gesamtproteinzunahme während der AcMNPV-Infektion

A) Es wurde die Zellzahl von uninfectierten (un), mock-infizierten (mock) und AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen und TN-368-Zellen 8 und 24 h p.i. bestimmt. Die Zellzahl der uninfectierten Zellen wurde 4 h p.i., die der mock-infizierten Zellen 24 h p.i. bestimmt. Es wurde für jede Zelllinie und für jeden Infektionszeitwert der Durchschnitt der Zellzahlen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (Y-Achse). Der Faktor der Zellzunahme bezogen auf uninfectierte Zellen ist angegeben. **B)** Aus uninfectierten und aus AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen und TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Die Gesamtproteinkonzentration der Zellextrakte wurde mit einem BCA-Test bestimmt. Es wurde für jede Zelllinie und für jeden Infektionszeitwert der Durchschnitt der Proteinkonzentration aus drei unabhängigen Experimenten gebildet (Y-Achse). Der Faktor der Proteinzunahme bezogen auf uninfectierte Zellen ist aufgeführt. Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben.

Zu späteren Zeitpunkten war keine weitere Zellzunahme zu erkennen. Dagegen nahm die Proteinkonzentration der Zellen bis in die sehr späte Infektionsphase bei 72 h p.i. in Sf21-Zellen durchschnittlich um einen Faktor von ca. 4 und in TN-368-Zellen um das 9-fache zu (Abb. 9 B). Dies ist auf die Hyperexpression der sehr späten viralen Proteine P10 und Polyhedrin zurückzuführen. Das Auftragen gleicher Proteinmengen pro Gelspur würde daher das Ergebnis für andere Proteine in Expressionsstudien mittels Western Blot-Analysen verfälschen. Aus diesem Grund wurden für alle Infektionszeitpunkte gleiche Volumina der Proteinextrakte, die in etwa gleichen Zellzahlen entsprachen, pro Spur in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen.

8.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

In einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von SDS aufgetrennt. SDS bindet dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Proteine, und bewirkt so eine negative Überschussladung. Außer dem Molekulargewicht bestimmt die Porengröße des Gels, die von der Acrylamidkonzentration, sowie der Konzentration des Vernetzungsreagenz N,N'-Methylenbisacrylamid abhängt, die Länge der Wanderungsstrecke eines Proteins im Gel. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins ist proportional zur Feldstärke und zur Ladung des Proteins, aber umgekehrt proportional zu seiner Größe und dem Vernetzungsgrad des Gels. Durch den Vergleich zu einem parallel zur Proteinprobe auf das Gel aufgetragenen Molekulargewichtsmarker, lassen sich die Molekulargewichte der einzelnen Komponenten bestimmen. Die radikalisch verlaufende Polymerisation des Gels wird durch ein Initiator-Redoxsystem aus APS und TEMED gestartet.

In einem diskontinuierlichen Puffersystem wurden die Proteine zuerst in einem großporigen Sammelgel bei niedrigem pH fokussiert, während die eigentliche Auftrennung in einem hochprozentigen Trenngel bei hohem pH erfolgte. Das Trenngel (8, 10 oder 15% Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1), 0,1% SDS, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 150 µl APS (10%), 6 µl TEMED) wurde zwischen zwei Platten (10 x 8 cm) einer Gießkammer gegossen, und zur Bildung einer glatten Trennschicht mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, und das Sammelgel (5% Acrylamid, 0,1% SDS, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 80 µl APS (10%), 8 µl TEMED) über das Trenngel gegossen. Zur Bildung von Geltaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach

vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Proteingelkammer (Firma Hoefer) eingesetzt, und der Kamm entfernt.

Die Proteinproben wurden in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer für 5 min. aufgekocht bevor sie mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 40 mA mit konstantem Stromfluss für ca. 1,5 Stunden in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer.

8.5. Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen mit anschließendem immunchemischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper („Western Blotting“) (Towbin et al., 1979)

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine PVDF- oder Nitrozellulosemembran transferiert. Dies geschah durch einen Elektrottransfer der Proteine mit Hilfe einer Nassblot-Apparatur der Firma BioRad. Es wurden pro Gel zwei Lagen Whatman-Filterpapier und eine Lage der Membran auf die Größe des Gels zurecht geschnitten, und ebenso wie zwei Fleece in Western-Blot-Puffer getränkt. Auf dem einen Fleece wurde eine Lage Filterpapier, die angefeuchtete Nitrozellulosemembran, das Proteingel, und eine weitere Lage Filterpapier angeordnet. Das zweite Fleece wurde zuoberst gelegt, und mit Hilfe einer Halterung Druck auf die Anordnung ausgeübt, die in einen Elektrobloetter-Tank mit der Membran auf der Anodenseite gestellt wurde. Der Tank wurde mit Western-Blot-Puffer aufgefüllt, woraufhin der Proteintransfer auf die Membran bei 4°C und 120 mA (ca. 40 V) für ca. 2 Stunden erfolgte. Der vollständige Transfer konnte sowohl anhand des aufgetrennten und bereits mit Farbstoff markierten Proteingrößenmarkers, als auch durch eine Färbung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran kontrolliert werden. Dazu wurde die Membran für 10 min. auf einem Wipptisch in einer Ponceau S-Lösung inkubiert, in H₂O gewaschen, und in einem Dokumentationsgerät (Pharmacia Biotech) fotografiert. Die Nitrozellulosemembran wurde zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen über Nacht in einer 5%igen Milchpulver-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Daraufhin wurde ein immunchemischer Nachweis der gebundenen Proteine durchgeführt, wobei alle nachfolgenden Inkubationen bei RT auf einem Wipptisch erfolgten. Die Antiseren wurden in 5%iger Milchpulver-Lösung verdünnt. Nach dem Blocken der Membran erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde in 10 ml der primären Antikörper-Verdünnung. Danach wurden die ungebundenen Antikörper entfernt, indem die Membran für 3 x 15 min. in PBS-T

gewaschen wurde. Die zweite Antikörper-Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 Stunde, in der sekundäre, anti-Kaninchen-Antikörper und anti-Maus-Antikörper in 10 ml 5%iger Milchpulver-Lösung eingesetzt wurden. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T für jeweils 20 min. wurden die Proteine nachgewiesen. Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 des ECL™ Detektions-Kits (Amersham) in gleichem Volumenverhältnis gemischt, und anschließend auf die Membran gegeben. Dabei werden durch das Verfahren der verstärkten Chemilumineszenz aus H_2O_2 enzymatisch Sauerstoffradikale erzeugt, die unter Freisetzung von Licht die Reagenz Luminol oxidieren. Nach einer einminütigen Inkubation der Membran mit dem Lösungsgemisch wurde die Membran in Folie eingelegt, und in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm bei RT für 5 sec. bis 45 min. exponiert. Der Röntgenfilm wurde schließlich in einer Entwicklermaschine entwickelt.

8.6. Zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (2-D-Gelanalysen) mit anschließender Western Blot- oder MALDI-TOF-Analyse (Yip und Hutchens, 1992; Pieles et al., 1993)

Mit Hilfe der zweidimensionalen (2-D) Gelelektrophorese lassen sich komplexe Proteingemische trennen. Die erste Dimension erfolgte durch die Immobilin-Technologie (IPG-Strips) als denaturierende isoelektrische Fokussierung (IEF), wobei ein pH-Gradient von 6 bis 11 verwendet wurde. Im nächsten Schritt folgte eine SDS-PAGE als zweite Dimension.

Zur Durchführung von 2-D-Gelanalysen wurden 16 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte von AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen hergestellt. Die weitere Durchführung der Experimente erfolgte in der Zentralen Bioanalytik des ZMMK der Universität zu Köln. Die Proteinproben wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Anschließend wurden die Proteinproben parallel auf zwei 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Bei einem Gel für Western Blot-Nachweise wurden 75 µg Proteine aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf das andere Gel für nachfolgende MALDI-TOF-Analysen wurden 250 µg Kernproteine aufgetragen. Das analytische Gel wurde mit SYPRO Ruby angefärbt und das Signalmuster mit dem der Western Blot-Analyse verglichen. Aus dem analytischen Gel wurden die der Western Blot-Membran entsprechenden Signale ausgestochen und mit Hilfe der MALDI-TOF-Methode weiter untersucht.

Bei der MALDI-(„Matrix assisted laser desorption/ionization“)-TOF-(„time-of flight“)-Analyse handelt es sich um eine Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie. Während die zu analysierenden Moleküle durch ein elektrisches Feld auf einen

Detektor hin beschleunigt werden, wird die Flugzeit als Parameter ihrer Masse bestimmt. Auf diese Weise lassen sich Biomoleküle mit großen Massen analysieren.

9. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung und -mikroskopie

(Harlow und Lane, 1988)

Zum Nachweis zellulärer oder viraler Antigene und deren subzellulärer Lokalisierung können markierte Antikörper genutzt werden, wodurch Einblicke in die Charakteristika des Antigens gewonnen werden können. Hierzu werden Zellen fixiert und durch die Behandlung mit einer Proteinlösung werden unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper blockiert. Nach der Bindung eines primären Antikörpers, der spezifisch ein bestimmtes Antigen erkennt, erfolgt sein Nachweis durch einen sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper. Dieser sekundäre Antikörper ist gegen ein Epitop des ersten Antikörpers gerichtet, und emittiert nach Anregung mit Fluoreszenzlicht Licht einer bestimmten Wellenlänge, das unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

9.1. Zellpräparation

Um eine indirekte Immunfluoreszenz durchführen zu können, wurden Zellen auf 20 x 20 mm großen Deckgläsern ausgesät, die nach einer Sterilisation durch Eintauchen in 96%iges Ethanol und nach Abbrennen in einer Bunsenbrennerflamme in 6-Loch-Gewebekulturplatten überführt wurden.

Insektenzellen wurden mit TC-100-Medium verdünnt und 0,5 ml der Zellkulturen auf die Deckgläser ausgesät, so dass sich 5×10^4 TN-368-Zellen bzw. 1×10^5 Sf21-Zellen auf den Deckgläsern befanden. Nach dem Absetzen wurden die Zellen mit ca. 1,5 ml TC-100-Medium mit 10% FCS überschichtet und über Nacht bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden die Insektenzellen mit AcMNPV infiziert, mit BrdU behandelt, mit zellulären Inhibitoren inkubiert oder es wurden unbehandelte Zellen analysiert.

HFFF2-Zellen wurden mit Zellkulturmedium verdünnt und 1×10^5 HFFF2-Zellen in 2 ml Medium pro Loch einer 6-Loch-Gewebekulturplatte, in dem sich ein Deckglas befand, ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit HSV-1 infiziert, mit BrdU behandelt, mit PAA für Inhibitorstudien inkubiert oder unbehandelt fixiert.

9.2. Fixierung der Zellen durch Vernetzung (Paraformaldehyd-Fixierung)

Durch die Fixierung der Zellen sollte das Antigen immobilisiert, aber seine authentische Struktur und subzelluläre Lokalisierung bewahrt bleiben. Die zellulären Strukturen sollten ebenfalls erhalten werden, jedoch sollten Antikörper zu den zellulären Kompartimenten gelangen können. Paraformaldehyd fixiert die Zellen, indem es intermolekulare Brücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine ausbildet, und somit ein Netzwerk zwischen den Antigenen entsteht. Die Zellen wurden 2 x in PBS gewaschen, für 15 min. bei RT in 2 ml einer 2%igen Paraformaldehyd/PBS-Lösung pro Deckglas in einem Loch einer 6-Loch-Gewebekulturplatte fixiert, und anschließend nochmals in PBS gewaschen. Die Zellen konnten in PBS über Nacht bei 4°C gelagert werden. Zur Unterdrückung der Eigenfluoreszenz des Paraformaldehyds, wurden die Zellen mit einer 0,1 M Glycin-Lösung in PBS für 10 min. bei RT gewaschen. Die Paraformaldehyd-Fixierung ließ die zellulären Membranen intakt, weshalb sie zusätzlich für 15 min. bei RT mit einer 0,1%igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert werden mussten. Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen.

9.3. Markierung der Zellen mit BrdU und Denaturierung der DNA in BrdU-markierten Zellen

BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) ist ein Nukleotidanalagon, das während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird und damit zur Markierung sich replizierender DNA-Bereiche benutzt werden kann. Zur Markierung mit BrdU wurde eine Stunde vor der Fixierung eine BrdU-Stammlösung in das Zellkulturmedium gegeben, so dass eine Endkonzentration von 50 µM BrdU erreicht wurde. Im Gegensatz zu allen anderen Zellpräparaten wurden BrdU-markierte Zellen nach der Paraformaldehyd-Fixierung und der Permeabilisierung durch Triton-X-100 zur Denaturierung der DNA für 2 min. mit 0,07 N NaOH behandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 x in PBS gewaschen.

9.4. Antikörperbindung

Zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen wurden die fixierten Zellen 30 min. bei RT in 80 µl einer sterilfiltrierten, 2%igen BSA-Lösung pro Deckglas auf Parafilm inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für 1 Stunde bei RT mit 50 µl der verdünnten Lösung

eines primären Antikörpers behandelt. Die Verdünnungen der primären Antikörper erfolgte in einer 2%igen BSA-Lösung. Um ungebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurden die Präparate 3 x in einem großen Volumen PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Zellen mit in 2%iger BSA-Lösung verdünnten, sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Das Volumen betrug 50 µl und die Inkubation fand für 30 min. bei RT und aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome im Dunkeln statt. Schließlich wurden die Zellen 3 x in einem großen Volumen PBS gewaschen, um nicht gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen. Die Verdünnungen der Antikörper wurden in vorhergehenden Testversuchen optimiert.

Die Präparate wurden anschließend in einem AF100:CFPVOH Mediumgemisch im Verhältnis 1:10 (Firma Citifluor), das als Antibleichmittel das frühzeitige Ausbleichen der Fluorochrome durch Lichteinstrahlung verhindert und sie stabilisiert, auf einem Objektträger eingebettet, mit Hilfe von Nagellack an den Rändern abgedichtet, und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

9.5. Doppelfärbungen

Mit der Technik der indirekten Immunfluoreszenz können durch Doppelfärbungen die subzellulären Lokalisierungen von zwei verschiedenen Antigenen simultan nachgewiesen werden. Dabei kann die Lokalisierung des einen Antigens in Relation zur Lokalisierung des anderen Antigens analysiert werden. Es ist wichtig für die Doppelfärbung, dass die beiden Antigene von zwei verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden, indem primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet werden. Mit Hilfe von sekundären Antikörpern, die speziesspezifisch die primären Antikörper erkennen und verschiedene Fluorochrome tragen, kann das eine Antigen vom anderen unterschieden werden. Doppelfärbungen mit zwei verschiedenen primären und sekundären Antikörpern erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bereits im Abschnitt 9.4. angegeben. Dazu wurden die beiden primären bzw. sekundären Antikörper gleichzeitig in einer Inkubationslösung verwendet.

9.6. Fluoreszenzmikroskopie

9.6.1. Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Zellen in Gewebekulturschalen wurden an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 135) mit einem Intas-Kamerasystem (Mikroskop Imager Typ Focus 400) ausgewertet. Die in dieser Arbeit dargestellten UV-Licht- und Phasenkontrastaufnahmen wurden mit einem 20 x Objektiv (0,4 numerische Apertur) aufgenommen.

9.6.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Konfokale Analysen aller indirekten Immunfluoreszenzexperimente wurden mit dem Mikroskopsystem TCS-SP/2 der Firma Leica Mikrosysteme an einem aufrechten Leica DMRE Mikroskop durchgeführt. Bilder der Proben wurden mit einem 63 x Objektiv (1,32 numerische Apertur) aufgenommen. Es sind jeweils Schnitte der Zellen mit einer Dicke von ca. 0,5 μm gezeigt.

IV. Ergebnisse

Es wird angenommen, dass TBP als Hauptkomponente des basalen Transkriptionsfaktors TFIID während des baculoviralen Infektionszyklus an der frühen viralen Transkription, die durch die zelluläre RNA-Polymerase II vermittelt wird, beteiligt ist (Rasmussen und Rohrmann, 1994). Die Rolle von TBP in der späten und sehr späten viralen Genexpression, die durch eine vom Virus kodierte RNA-Polymerase ausgeführt wird (Grula et al., 1981; Guarino et al., 1998 a), ist unklar.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die AcMNPV-Infektion die Expression und subzelluläre Lokalisierung von TBP beeinflusst. Daraufhin wurden funktionelle Studien durchgeführt, um die Auswirkung der Reduktion von TBP sowie von baculoviralen Transkriptions- und Replikationsfaktoren durch RNA-Interferenz auf die Virusinfektion zu analysieren. Schließlich wurden Studien initiiert, die mögliche Auswirkungen der Baculovirusinfektion auf die Expression von Insekten-TAFs zeigen sollten. Vergleichsstudien über die Expression und Lokalisierung von TBP und TAFs wurden in primären humanen Zellen im Infektionsverlauf des humanpathogenen HSV-1 durchgeführt.

1. Untersuchungen zur Expression und Lokalisierung von TBP im baculoviralen Infektionsverlauf

Die Expression und Lokalisierung von TBP während der AcMNPV-Infektion wurde in den permissiven Insektenzelllinien TN-368 und Sf21 untersucht.

1.1. Expression von TBP im baculoviralen Infektionsverlauf

1.1.1. TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

Generell wird die Proteinsynthese der Wirtszellen während der Virusinfektion herunter reguliert (Carstens et al., 1979; Wood, 1980). Wenn TBP eine Rolle in der Regulation der späten und sehr späten viralen Transkription ausübt, ist das Vorhandensein von TBP während der späten Infektionsphase eine Voraussetzung. Somit wurde als erstes die Expression von TBP im AcMNPV-Infektionsverlauf untersucht. Die Insektenzelllinie Sf21 wurde mit einer Infektionsmultiplizität von 10 infektiösen Partikeln pro Zelle infiziert. Es wurden nukleäre

Detergenzproteinextrakte aus uninfizierten und infizierten Sf21-Zellen hergestellt und durch Western Blot-Studien analysiert (Abb. 10).

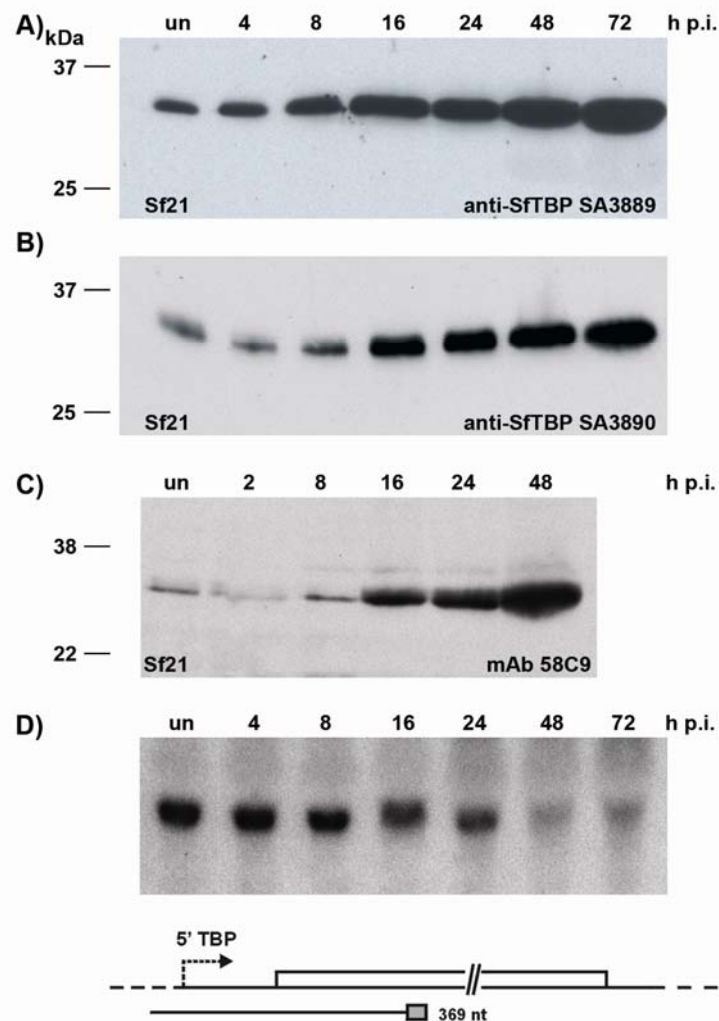


Abb. 10: Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

Aus 2×10^6 uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. (A, B) oder 2, 8, 16, 24 und 48 h p.i. (C) nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 μ l Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (A), polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (B) oder monoklonalem dTBP-Antikörper (58C9) (Maus) (C) durch Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Proteinstandards sind links angegeben. D) 100 μ g Gesamt-RNA wurde aus uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. präpariert und auf einem 2,2 M Formaldehyd enthaltenen 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die RNAs wurden mit einer TBP-spezifischen 369 nt langen Sonde nachgewiesen. Die schematische Darstellung des offenen TBP-Leserasters mit der angenommenen Transkriptionsstartstelle und der Position der RNA-Sonde ist angegeben. Der graue Kasten markiert den T7 Promotor.

Dazu wurden zwei verschiedene, aus Kaninchen stammende, polyklonale Antiseren (anti-SfTBP SA3889 und anti-SfTBP SA3890) verwendet. Die Seren sind gegen die in Bakterien überexprimierte 25 kDa grosse N-terminale Domäne von TBP aus Sf21-Zellen gerichtet (Mans, Kremer und Knebel-Mörsdorf, nicht veröffentlicht). Ein gegen die hoch konservierte C-terminale Domäne von TBP aus *Drosophila melanogaster* gerichteter monoklonaler

Antikörper (mAb 58C9) aus der Maus wurde vergleichend eingesetzt. Nukleäre Proteinfraktionen wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Sowohl das anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum als auch das anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum erkannten in uninfizierten und AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen ein Polypeptid von ca. 34 bis 36 kDa, das dem vorhergesagten Molekulargewicht des Produktes des offenen TBP-Leserasters entspricht (Abb. 10 A, B). Interessanterweise konnte ein signifikanter Anstieg der TBP-Proteinmenge in Extrakten, die in der späten und sehr späten Infektionsphase 16 bis 72 h p.i. präpariert wurden, festgestellt werden. Zum Vergleich wurden Untersuchungen mit dem gegen *Drosophila*-TBP (dTBP) gerichteten monoklonalen Antikörper mAb 58C9 vorgenommen. Auch in diesen Analysen konnte ab 16 h p.i. eine deutliche Zunahme der TBP-Proteinmenge beobachtet werden (Abb. 10 C; Quadt et al., 2002).

Eine mögliche Erklärung für die TBP-Proteinzunahme könnte eine transkriptionelle Aktivierung des *tbp*-Gens durch die virale Infektion sein. Zu diesem Zweck wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt, bei denen Gesamt-RNA aus uninfizierten und AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen eingesetzt wurde. Es konnte ein gleich bleibendes Niveau des TBP-Transkripts bis 24 h p.i., gefolgt von einer abnehmenden, jedoch noch immer nachweisbaren Menge des TBP-Transkripts bis 72 h p.i. beobachtet werden (Abb. 10 D; Quadt et al., 2002). Diese Ergebnisse wurden durch Ribonuklease-Schutzexperimente bestätigt (Daten nicht gezeigt). Somit zeigte die transkriptionelle Analyse, dass die starke Zunahme des TBP-Proteins nicht von einer verstärkten Transkription des *tbp*-Gens in der späten Phase der Infektion herrührte.

1.1.2. TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Zum Vergleich der TBP-Expressionsstudien in Sf21-Zellen wurden TN-368-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität von 20 pfu pro Zelle infiziert. In TN-368-Zellen waren in uninfizierten Zellen und 4 h p.i. nur sehr schwache Signale bei ca. 34 kDa mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum sichtbar, die ab 8 h p.i. bis 24 h p.i. verstärkt zu erkennen waren (Abb. 11 A). Ab 48 h p.i. war diese Bande nicht mehr nachweisbar. Ab 8 h p.i. wurde zusätzlich eine zweite Bande detektiert, die ca. 2 bis 3 kDa über der beschriebenen Bande in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen lief und bis 48 h p.i. an Intensität zunahm. Bis 72 h p.i. blieb die hohe Signalstärke dieser oberen Bande erhalten. Im Vergleich wurde in TN-368-Zellen das

anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum verwendet, wobei in diesem Fall nur eine einzelne Proteinbande von ca. 34 kDa detektiert wurde (Abb. 11 B).

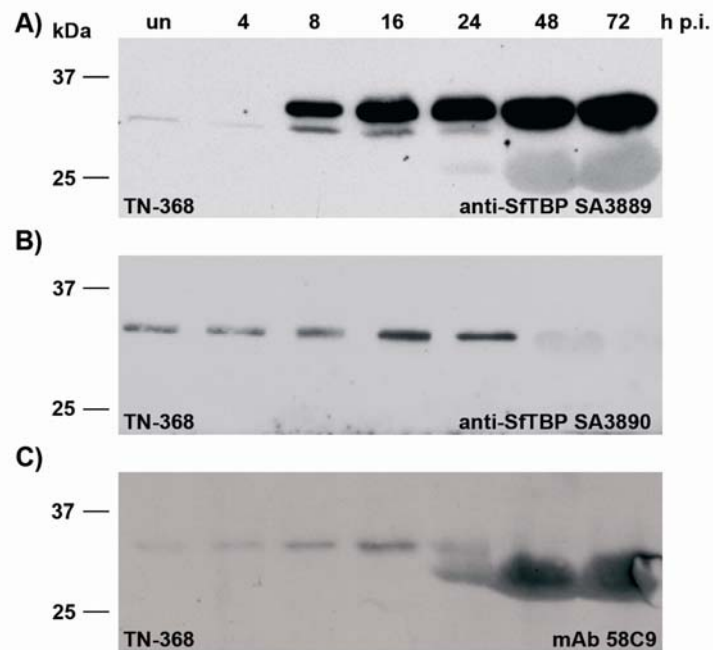


Abb. 11: Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Aus 6×10^5 uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 10 μ l Zellextrakt aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von TBP erfolgte mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (A), polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (B) oder mit monoklonalem dTBP-Antikörper (58C9 aus Maus) (C; Günther, 2005).

Die Bandenintensität verlief parallel zur unteren Bande in Abb. 11 A mit einer Zunahme der Signalstärke ab 8 h p.i. und einem Intensitätshöhepunkt bei 16 h p.i.. Ab 24 h p.i. war eine leichte Abnahme des Signals zu erkennen und ab 48 h p.i. war kein Nachweis des Signals mehr möglich. Die Verwendung des gegen *Drosophila*-TBP (dTBP) gerichteten monoklonalen Antikörpers mAb 58C9 zeigte einen ähnlichen Signalverlauf, wie er bei der Verwendung des anti-SfTBP SA3890 Kaninchensersums beschrieben wurde. Auch in diesem Fall konnte 16 h p.i. ein Höhepunkt der Signalintensität festgestellt werden (Abb. 11 C). Die Expositionszeit mit dem monoklonalen Antikörper mAb 58C9 lag sehr viel höher als bei Verwendung der anti-SfTBP Kaninchenseren (persönliche Mitteilung von K. Günther). Bei den zusätzlichen Hintergrundsignalen bei ca. 29 kDa handelte es sich um Kreuzreaktionen der Antikörper mit dem hyperexprimierten AcMNPV-Protein Polyhedrin (Abb. 11 A, C). Die Ergebnisse mit dem anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum und dem monoklonalen Antikörper mAb 58C9 weisen auf eine TBP-Zunahme in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen hin. Im Gegensatz zu Sf21-Zellen wurde jedoch eine Abnahme in der sehr späten Infektionsphase

beobachtet. Die Spezifität der mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum in TN-368-Zellen nachgewiesenen oberen Bande blieb zunächst offen.

1.1.3. Quantifizierung der TBP-Proteinmengen in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Zur Quantifizierung der TBP-Signalintensitäten wurden die Western Blot-Analysen mit dem anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum ausgewertet (Software: „Image J“) (Abb. 12). Die TBP-Proteinmenge in Sf21-Zellen nahm, bezogen auf uninfizierte Zellen, ab 8 bis 16 h p.i. um das 1,7-fache bzw. 2,3-fache zu. 48 h p.i. lag eine 4-fache Menge an TBP vor. Die TBP-Menge blieb in Sf21-Zellen bis 72 h p.i. erhalten, gefolgt von einer Abnahme bis 96 h p.i., wobei zu diesem Zeitpunkt die virusinduzierte Lyse der Zellen bereits einsetzte.

In TN-368-Zellen ergab sich ab 8 h p.i. ein 1,9-facher TBP-Anstieg mit einem Signalintensitätsmaximum bei 16 h p.i., der einer 4-fachen Zunahme entsprach. Bis 24 h p.i. war eine Abnahme der Bandenstärke zu verzeichnen, wobei auch zu diesem Zeitpunkt die TBP-Menge, bezogen auf uninfizierte Zellen, noch 3-fach erhöht vorlag. Ab 48 h p.i. war eine deutliche Reduktion von TBP zu messen (Abb. 12). Der schnellere Anstieg in TN-368-Zellen im Vergleich zu Sf21-Zellen kann durch den schnelleren Infektionszyklus von AcMNPV in TN-368-Zellen erklärt werden. Die drastische Abnahme der TBP-Signale nach 24 h p.i. könnte auf einem verstärkten Abbaumechanismus des Proteins in TN-368-Zellen beruhen.

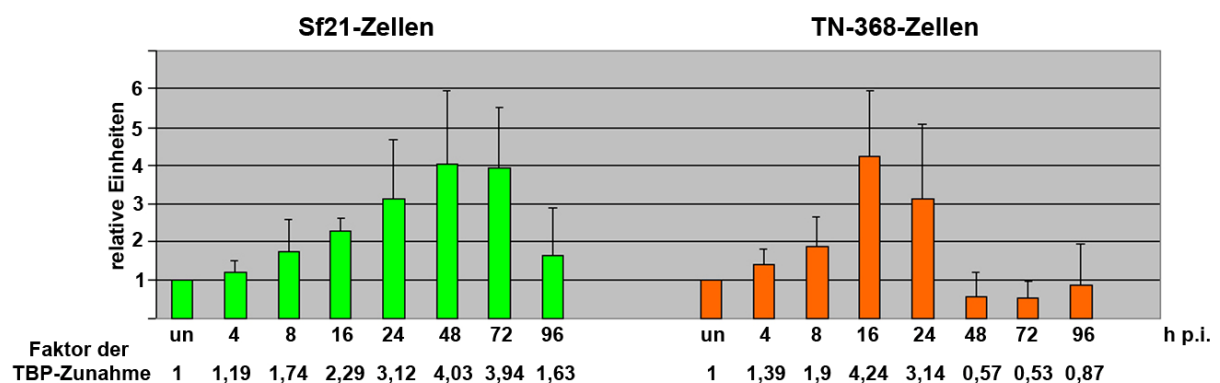


Abb. 12: Quantifizierung der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Aus uninfizierten (un) und AcMNPV-infizierten 2×10^6 Sf21-Zellen und 6×10^5 TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48, 72 und 96 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt und die Proteine aus jeweils gleichen Volumina der Zellextrakte unter Verwendung von polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum durch Western Blot-Analysen nachgewiesen. Die Quantifizierung der TBP-Proteinmengen erfolgte durch Auswertung von Western Blot-Signalen mit Hilfe der Software „Image J“. Es wurde für jede Zelllinie und für jeden Infektionszeitwert der Durchschnitt der Signalintensitäten aus drei unabhängigen Experimenten gebildet. Die TBP-Menge in uninfizierten Zellen wurde für jede Zelllinie gleich eins gesetzt. Die TBP-Proteinmengen der anderen Zeitwerte sind in relativen Einheiten bezogen auf uninfizierte Zellen angegeben (Y-Achse). Der Faktor der TBP-Zunahme ist dargestellt. Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben.

1.1.4. Spezifitätsanalysen der anti-SfTBP-Antiseren

Zur Aufklärung der mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum in der späten Phase der AcMNPV-Infektion nachgewiesenen Doppelbande in TN-368-Zellen (Abb. 11 A) wurden 2-D-Gelexperimente mit nachfolgenden MALDI-TOF-Analysen durchgeführt. Dazu wurden 16 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte von AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen hergestellt. Die präzipitierten Proteinproben wurden parallel auf einem SDS-Polyacrylamidgel für Western Blot-Nachweise mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum, und auf einem anderen Gel für anschließende MALDI-TOF-Analysen aufgetrennt. Die Western Blot-Analysen ergaben fünf bis sechs Signale bei ca. 36 kDa und einem pI zwischen ca. 6 und 7,5 (Abb. 13 A). Aus dem analytischen Gel wurden die der Western Blot-Membran entsprechenden Signale ausgestochen und mit Hilfe der MALDI-TOF-Methode analysiert. Dies ergab Sequenz-übereinstimmungen mit dem baculoviralen DNA-Binde-Protein DBP. Somit schien die obere mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum nachgewiesene Bande in Abb. 11 A keine modifizierte Form des TBP-Proteins darzustellen, sondern dem AcMNPV DBP-Protein zu entsprechen.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde die Säugerzelllinie MDCK II mit der Plasmid-DNA pCMV-DBP transfiziert bzw. blieb untransfiziert. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden nukleäre Proteinextrakte untersucht. Als Kontrolle diente ein nukleärer Detergenzextrakt, der 16 Stunden nach AcMNPV-Infektion aus TN-368-Zellen hergestellt wurde. Die Membranen wurden mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum oder mit einem der beiden anti-SfTBP Kaninchenseren SA3889 oder SA3890 inkubiert. Dies ergab eine Kreuzreaktion des anti-SfTBP SA3889 Kaninchensersums mit DBP in pCMV-DBP transfizierten MDCK II-Zellen (Abb. 13 B Mitte). Die Verwendung des anti-SfTBP SA3890 Kaninchensersums zeigte hingegen in den Western Blot-Analysen keinerlei Kreuzreaktion mit AcMNPV DBP (Abb. 13 B unten).

Zur Überprüfung der Wechselwirkungen der anti-SfTBP Kaninchenseren mit DBP in indirekten Immunfluoreszenzstudien wurden ebenfalls MDCK II-Zellen mit der Plasmid-DNA pCMV-DBP transfiziert oder blieben untransfiziert. Lokalisierungsstudien ergaben bei Verwendung des polyklonalen anti-DBP Kaninchensersums DBP-Kerndomänen in ca. 50% der Zellen (Abb. 13 C). Die Inkubation mit anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum ergab vereinzelt eine schwache Kernfärbung, wobei die Mehrzahl der MDCK II-Zellen keinerlei für DBP spezifische Kreuzreaktivität mit dem Antiserum erkennen ließ. Die Verwendung von anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum zeigte keine unspezifische Wechselwirkung mit DBP.

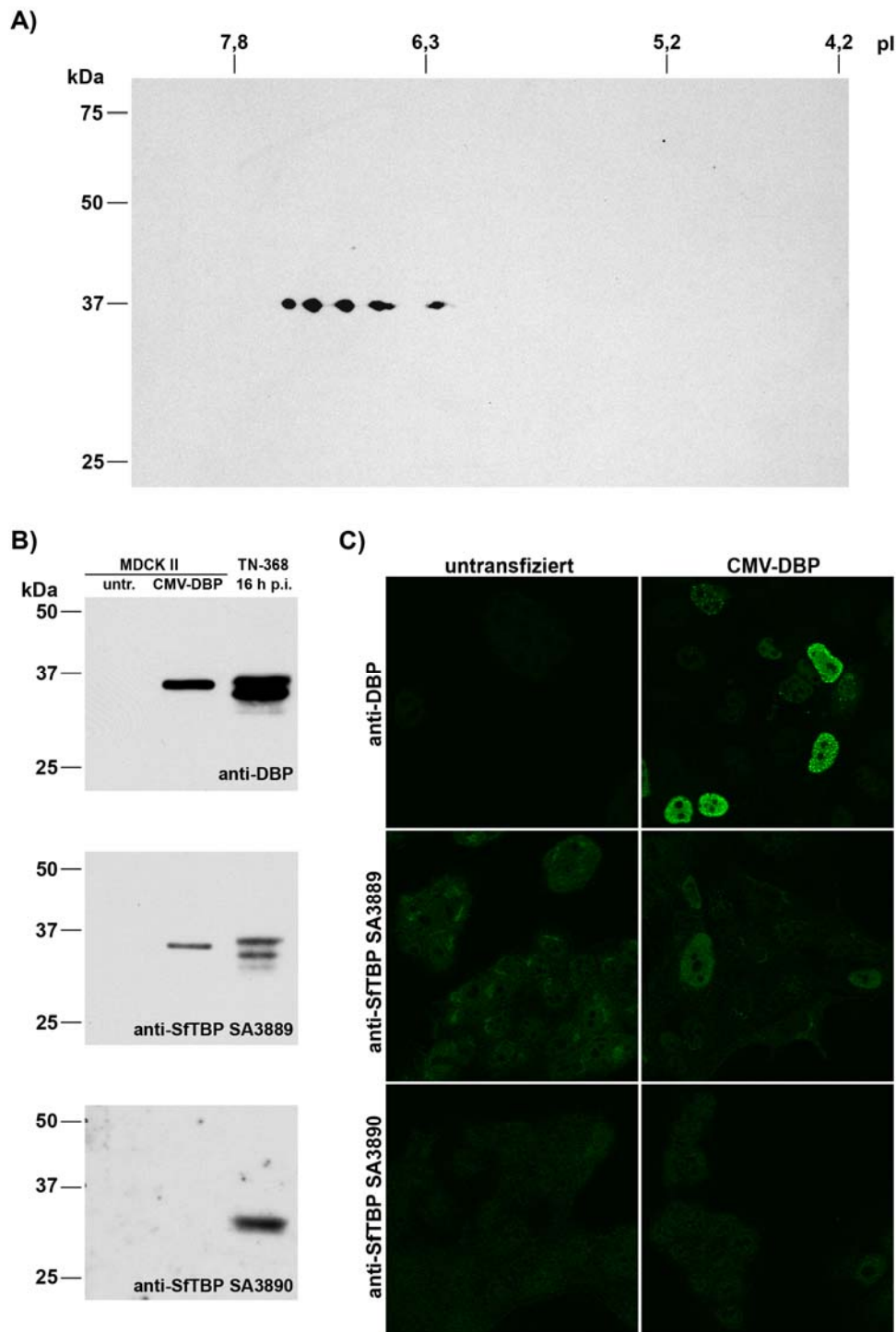


Abb. 13: Analyse der anti-SfTBP Antiserenspezifität

A) Aus 5×10^6 AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen wurden 16 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt und die Proteine durch 2-D-Gelanalysen aufgetrennt. Für Western Blot-Analysen wurden 75 μ g der Extrakte aufgetragen und auf einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Signale wurden mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum nachgewiesen. Die pI-Standards sind oben und die Proteinstandards sind links angegeben. B) Zur Untersuchung der Kreuzreaktivitäten der polyklonalen anti-SfTBP Kaninchenseren mit DBP wurden Gesamtzellextrakte nach der RIPA-Methode aus mit 2 μ g pCMV-DBP Plasmid-DNA transfizierten (CMV-DBP) und untransfizierten (untr.) MDCK II-Zellen hergestellt (Günther, 2005). Pro Spur wurde der Extrakt von ca. 6×10^4 MDCK II-Zellen aufgetragen. Zur Kontrolle wurde der nukleäre Detergenzextrakt von 6×10^4 AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen aufgetragen (16 h p.i.). Nach der Auftrennung der Proteine auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Membranen mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (oben), polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (Mitte) oder mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (unten) inkubiert. Die Proteinstandards sind links angegeben.

Abb. 13: Analyse der anti-SfTBP Antiserenspezifität (Fortsetzung von S. 67)

C) 3×10^5 MDCK II-Zellen blieben untransfiziert oder wurden mit 2 µg pCMV-DBP Plasmid-DNA (CMV-DBP) transfiziert (von V. Jaeger durchgeführt). Die Zellen wurden 24 h p.t. in 2% Paraformaldehyd fixiert. In indirekten Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (oben), polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (Mitte) oder mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (unten) inkubiert. Die Proteine wurden mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) durch konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht.

Aus diesen Spezifitätsanalysen ergab sich, dass das anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum in Western Blot-Studien mit AcMNPV DBP in der späten Infektionsphase kreuzreagierte, und in Lokalisierungsexperimenten in MDCK II-Zellen schwache Kreuzreaktionen mit DBP zeigte. Das anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum hingegen zeigte weder in Western Blot-Studien noch bei Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz-Methode eine unspezifische Wechselwirkung mit DBP. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher für Western Blot-Analysen das anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum verwendet.

1.2. Lokalisierungsstudien über TBP**1.2.1. Kolokalisierung von TBP mit viralen Replikationszentren**

Um Einblick in die subzelluläre Verteilung von TBP während des baculoviralen Infektionsverlaufs zu gewinnen, wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Dadurch sollten Hinweise auf mögliche Funktionen des TBP-Anstiegs in der späten Infektionsphase erlangt werden.

Zu Anfang der Lokalisierungsstudien in dieser Arbeit wurde das anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum, später dann das anti-SfTBP SA3890 Kaninchenserum eingesetzt. Aufgrund der zuvor beschriebenen TBP-Zunahme bis in die sehr späte Infektionsphase in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen wurden initiale Lokalisierungsstudien von TBP in Sf21-Zellen bis 24 h p.i. durchgeführt. Bei diesen Studien war TBP in uninfizierten Zellen in einem granulären Färbemuster im gesamten Zellkern zu finden, und lokalisierte ab 8 h p.i. in distinkten Kernstrukturen. Diese Kerndomänen fusionierten zu größeren Strukturen, bis in der sehr späten Phase der Infektion nur noch eine große Kernstruktur zu beobachten war (Daten nicht gezeigt; Quadt et al., 2002).

Ein Anstieg der TBP-Menge bis 24 h p.i. war sowohl in Sf21-Zellen, als auch in TN-368-Zellen zu beobachten (Abschnitt 1.1.). Aufgrund der besseren Auflösung der Kernstrukturen in TN-368-Zellen wurden die weiteren Analysen über die subzelluläre Verteilung von TBP während der AcMNPV-Infektion in TN-368-Zellen durchgeführt. TN-368-Zellen haben gegenüber den relativ kleinen und runden Sf21-Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Struktur, so

dass die Eigenfluoreszenz der Zellen minimiert ist. Auch in infizierten TN-368-Zellen konnte eine Relokalisierung von TBP in distinkte Kernstrukturen beobachtet werden.

Nach Färbung mit dem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum zeigten uninfizierte Zellen ein granuläres Färbemuster im ganzen Zellkern. In einzelnen Zellen konnte ab 4 h p.i. eine TBP-Relokalisierung beobachtet werden. Die Größe der TBP-Kerndomänen nahm bis 8 h p.i. zu (Abb. 14 A). 16 h p.i. und 24 h p.i. fusionierten die nukleären TBP-Domänen zu einer großen Kernstruktur, wobei die TBP-Strukturen während des gesamten Infektionsverlaufes ein granuläres Färbemuster zeigten (Abb. 14 A).

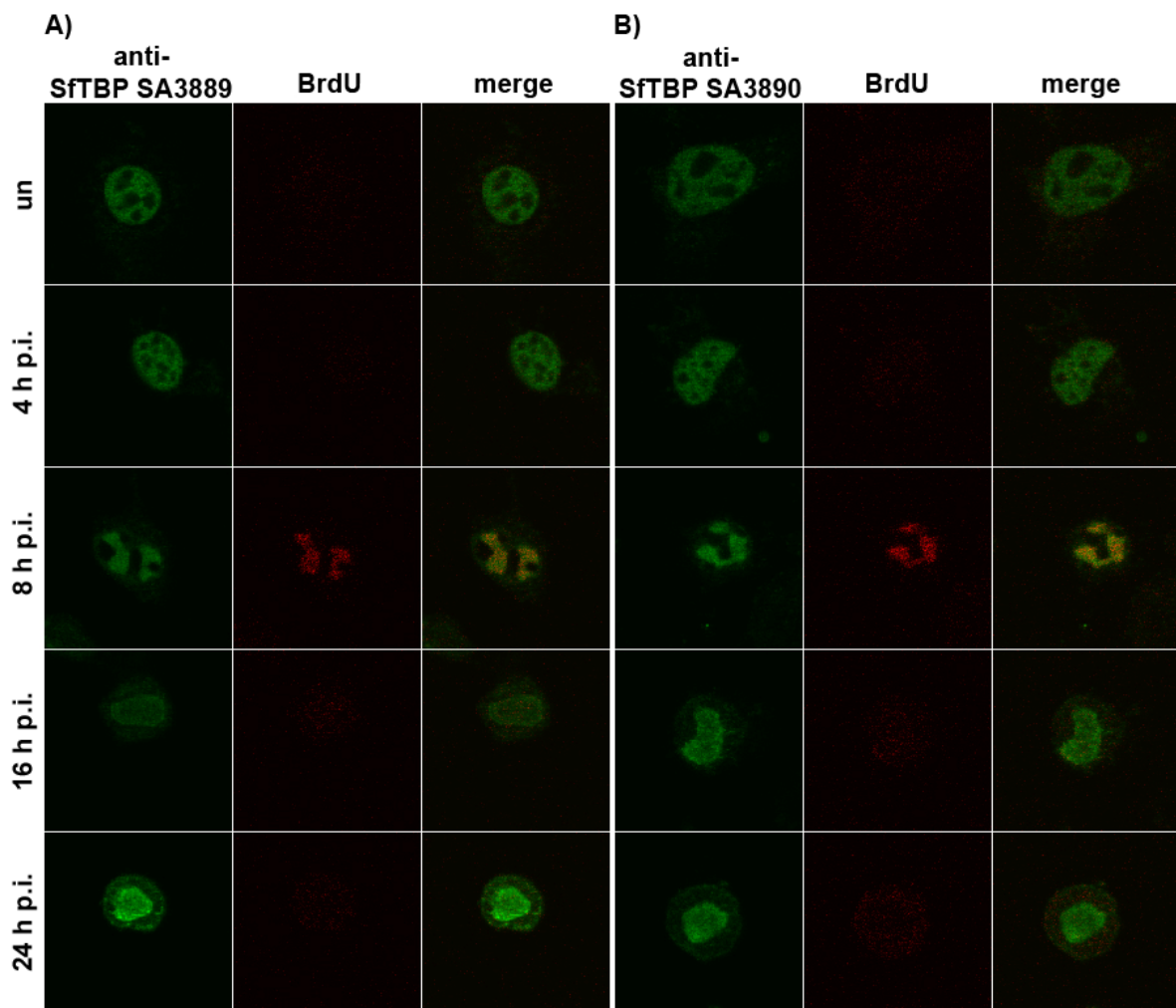


Abb. 14: Kolokalisierungsstudien von TBP- und BrdU-markierten Replikationszentren im baculoviralen Infektionsverlauf

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert. Die BrdU-markierten Zellen wurden 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (A) oder mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (B) und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU-Antikörper (Maus) inkubiert. TBP wurde jeweils mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und BrdU mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Signale einer Zelle in konfokalen Mikroskopaufnahmen ist jeweils rechts dargestellt (merge). Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an.

Da die beobachteten TBP-Strukturen im Zellkern dem Muster viraler Replikationszentren ähnelten, wurden uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen ab einer Stunde vor der Fixierung für die Markierung aktiver viraler Replikation mit dem Thymidinanalogon 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) inkubiert und 4, 8, 16 und 24 h p.i. fixiert. Virale Replikationszentren wurden in einzelnen Zellen ab 4 h p.i., sonst ab 8 h p.i. sichtbar (Abb. 14; Mainz et al., 2002). Die TBP-Strukturen kolokalisierten mit viralen Replikationszentren, sobald virale DNA-Replikation in distinkten Kerndomänen sichtbar wurde.

Da die Seren SA3889 und SA3890 unterschiedliche Bandenmuster in Western Blot-Analysen zeigten, wurden beide anti-SfTBP Kaninchenserum in Lokalisierungsexperimenten verglichen (Abb. 14 A, B). Die konfokalen mikroskopischen Analysen der TN-368-Zellen zeigten in der frühen Infektionsphase keinen signifikanten Unterschied im Färbemuster. Ab 8 h p.i. wurde mit beiden Seren eine Relokalisierung von TBP in distinkte virale Replikationszentren, die in der späten Infektionsphase zu größeren Kernstrukturen fusionierten, beobachtet.

Somit lieferten die Lokalisierungsstudien in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen die gleichen TBP-Färbemuster nach Einsatz beider anti-SfTBP Kaninchenserum.

1.2.2. Abhängigkeit der TBP-Relokalisierung von der baculoviralen DNA-Replikation

Zur Überprüfung, inwieweit die Relokalisierung von TBP im baculoviralen Infektionsverlauf mit der Ausbildung viraler DNA-Replikationszentren in kausalem Zusammenhang steht, wurden Lokalisierungsstudien unter Verwendung des DNA-Replikationsinhibitors Aphidicolin durchgeführt. Zunächst wurde die Wirkung von Aphidicolin überprüft, indem die Bildung von viralen Polyedern in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen untersucht wurde. Durch die Verwendung von 5 µg/ml Aphidicolin ab 1 h p.i. wurde die virale DNA-Replikation so weit gehemmt, dass in keiner Zelle mehr Polyeder gebildet wurden (Abb. 15 A).

In indirekten Immunfluoreszenzstudien wurde mit der Durchführung von BrdU-Pulsmarkierungsexperimenten die Kolokalisierung von TBP- und BrdU-markierten DNA-Replikationszentren mit und ohne Aphidicolin mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Abb. 15 B). In unbehandelten TN-368-Zellen konnten die ersten Orte aktiver viraler Replikation mit TBP-Kolokalisierung ab 4 h p.i. beobachtet werden. Die Größe der Replikationszentren nahm parallel mit den kolocalisierenden TBP-Kerndomänen 8 und 12 h p.i. zu. 16 h p.i. und in vereinzelter Zellen 24 h p.i. war virale Replikation in einer

großen Kerndomäne zu beobachten, die mit TBP kolokalisierte. Sowohl die TBP-Strukturen als auch die DNA-Replikationsstellen zeigten ein granuläres Färbemuster (Abb. 15 B links).

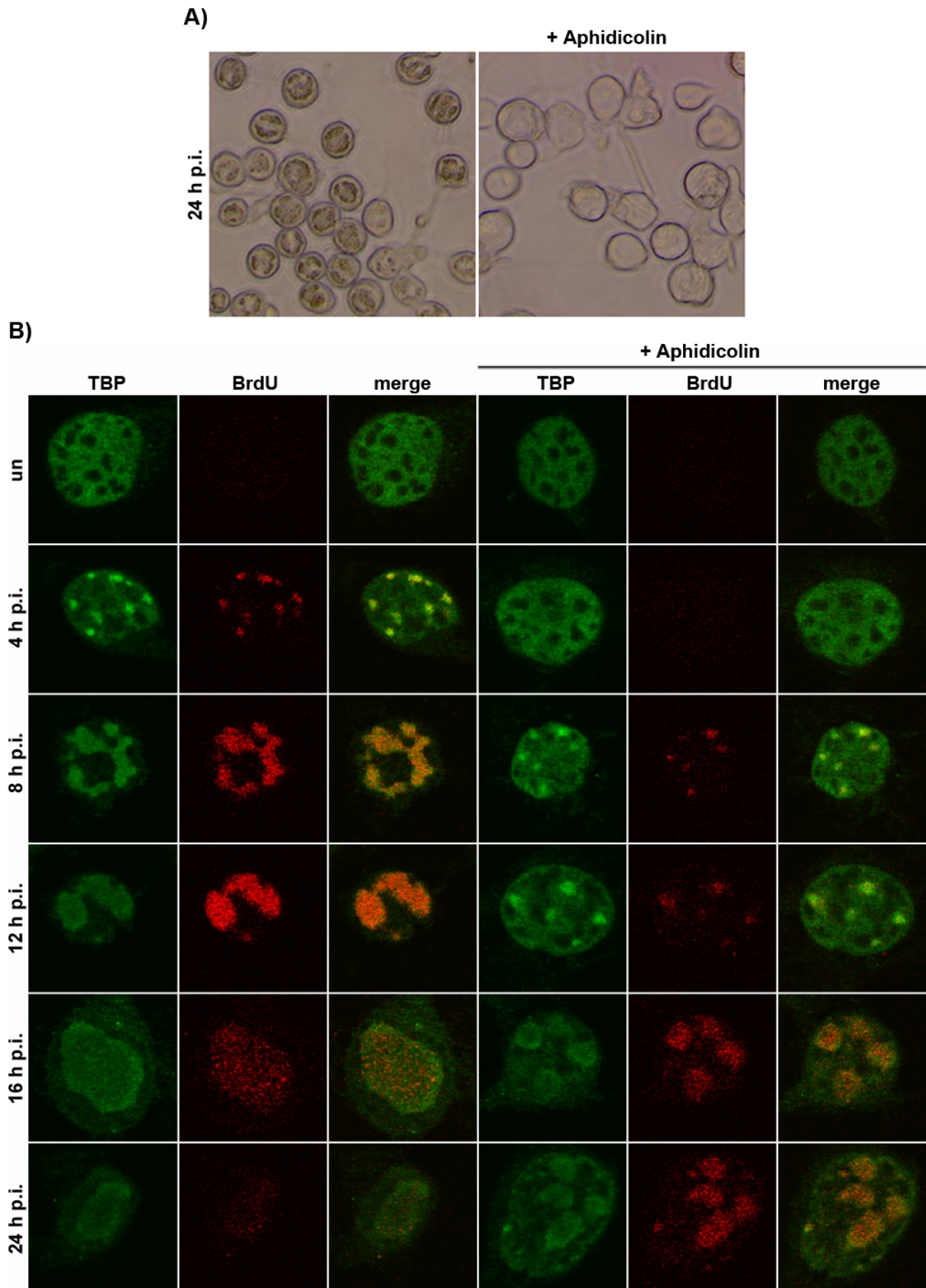


Abb. 15: TBP-Relokalisierung in Abhängigkeit von baculoviraler Replikation

Abb. 15: TBP-Relokalisierung in Abhängigkeit von baculoviraler Replikation (S. 71)

Bei uninfizierten und AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen erfolgte 1 h p.i. ein Mediumwechsel mit Aphidicolin-haltigem (5 µg/ml) Zellmedium (in **A** und **B** rechts dargestellt) oder mit normalem Insektenzellkulturmedium (in **A** und **B** links dargestellt). Die Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung in 2% Paraformaldehyd mit BrdU markiert. Die Fixierung der Zellen wurde 4, 8, 12, 16 und 24 h p.i. durchgeführt. **A)** Phasenkontrast-Aufnahmen 24 h p.i. sind dargestellt. **B)** Zum Nachweis von TBP wurden die Zellen mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU-Antikörper (Maus) inkubiert. TBP wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und BrdU mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der konfokalen Mikroskopiesignale einer Zelle ist jeweils rechts dargestellt (merge).

Nach Verwendung von 5 µg/ml Aphidicolin war eine deutliche Verzögerung der Replikationszentrenbildung zu beobachten. Die ersten sehr feinen Zentren der viralen DNA-Synthese waren ab 8 h p.i. sichtbar mit einer langsamen Größenzunahme während des Infektionszyklus 12, 16 und 24 h p.i.. Die Replikationszentren unter dem Einfluss von Aphidicolin erreichten 24 h p.i. eine Größe, die ohne den Inhibitor nach 8 h p.i. erreicht wurde (Abb. 15 B rechts). TBP kolokalisierte auch bei Verwendung von Aphidicolin während des gesamten Infektionszyklus mit den verzögert auftretenden Orten der viralen Replikation. Somit zeigte sich eine direkte Abhängigkeit der TBP-Relokalisierung von der Ausbildung viraler DNA-Replikationsdomänen im Zellkern.

1.2.3. Lokalisierung der zellulären RNAP II und Expression von LEF-4 als Komponente der viruskodierten RNA-Polymerase in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen**1.2.3.1. RNAP II-Lokalisierung während der Baculovirusinfektion**

Die baculovirale Transkription in der frühen Infektionsphase wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II (RNAP II) vermittelt (Fuchs et al., 1983; Hoopes and Rohrmann, 1991). Zur Untersuchung, ob die Lokalisierung von TBP in viralen Replikationszentren (Abb. 14, Abb. 15) eine direkte Verbindung zu der viralen Transkription in diesen Kerndomänen erkennen lässt, wurden Lokalisierungsstudien für die zelluläre RNA-Polymerase II durchgeführt. Dazu wurden TN-368-Zellen mit AcMNPV infiziert und 4, 8, 16 und 24 h p.i. fixiert. Für Kolokalisierungsstudien wurden das anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum und der monoklonale RNAP II-Antikörper 7C2, der gegen die C-terminale Domäne der größten RNAP II-Untereinheit gerichtet ist, eingesetzt. Konfokale Mikroskopaufnahmen zeigten sowohl für TBP als auch für die RNAP II eine diffuse bis granuläre Kernfärbung in uninfizierten Zellen (Abb. 16). 4 h p.i. begannen erste Umstrukturierungen beider Proteine in distinkte nukleäre Domänen, die bis 8 h p.i. an Größe zunahmen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde eine

Kolokalisierung von TBP und der RNAP II durch die Überlagerung der Signale in den Kerndomänen deutlich (Abb. 16).

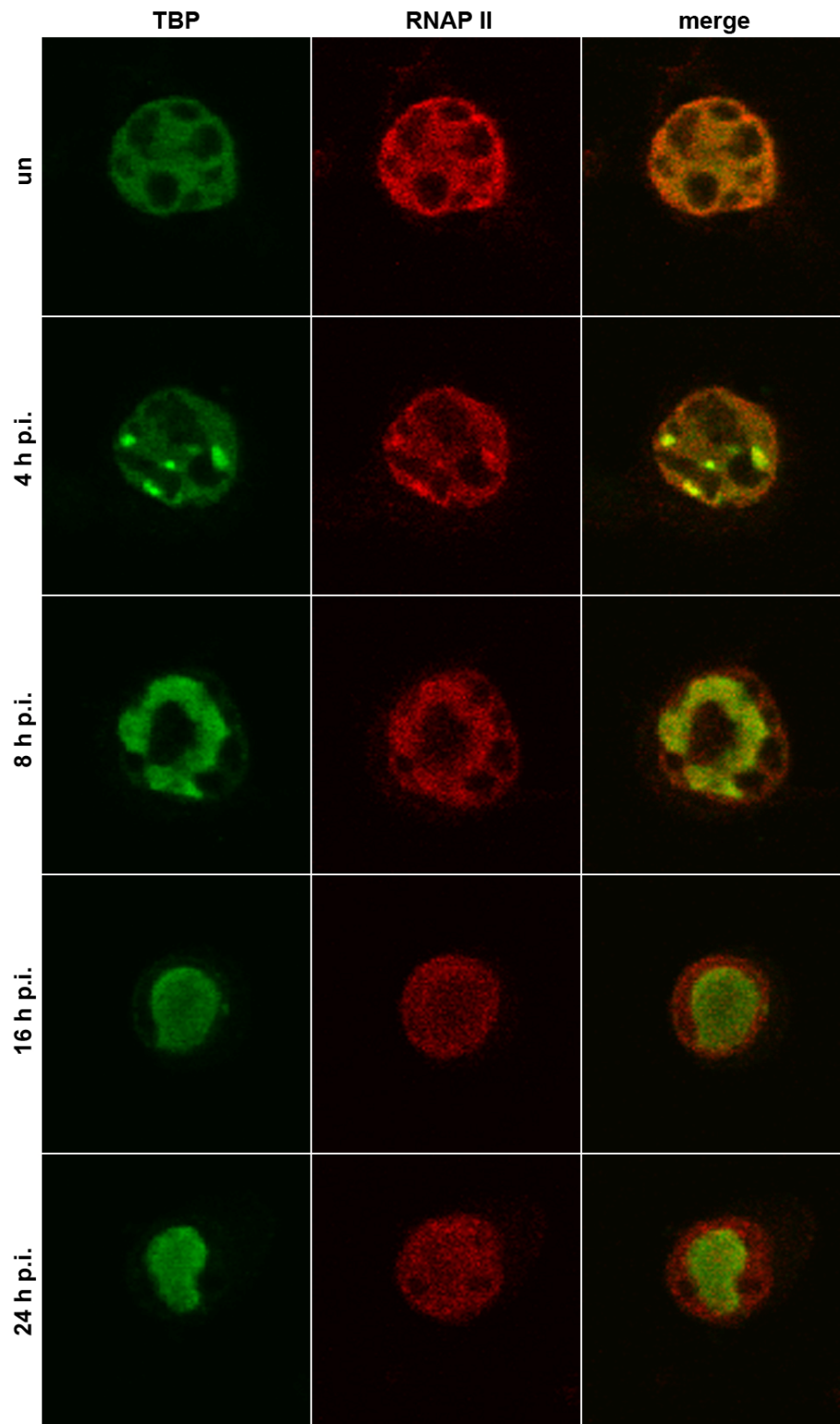


Abb. 16: Kolokalisierung von TBP und RNAP II im baculoviralen Infektionsverlauf

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP SA3889 Kaninchenserum und RNAP II mit monoklonalem RNAP II-Antikörper (7C2) (Maus) nachgewiesen. Dabei wurde TBP mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und RNAP II mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Die Überlagerung der konfokalen Signale einer Zelle ist dargestellt (merge), wobei gelbe Signale Kolokalisierung anzeigen.

In den späten Phasen der Infektion ab 16 h p.i. fusionierten die TBP-Signale zu einer großen Kerndomäne. Die RNAP II hingegen war in einem diffusen Färbemuster zu beobachten, das den gesamten Zellkern ausfüllte, und akkumulierte nicht länger in bestimmten Kernbereichen. Somit konnte eine Kolokalisierung von TBP und der RNAP II nur bis 8 h p.i. festgestellt werden (Abb. 16).

Diese Ergebnisse deuten auf eine virale Transkription durch die RNAP II und TBP in viralen Replikationszentren in der frühen Infektionsphase hin. Dies korreliert mit früheren Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass die zelluläre RNAP II nur an der frühen Transkription baculoviraler Faktoren beteiligt ist (Grula et al., 1981; Fuchs et al., 1983; Huh und Weaver, 1990). In der sehr späten Infektionsphase wurde eine diffuse Kernlokalisierung der RNAP II beobachtet, die auf einen Übergang zur Transkription durch die virusinduzierte RNA-Polymerase hindeutet.

1.2.3.2. LEF-4-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Es ist gezeigt worden, dass die späten Baculovirusgene und die hyperexprimierten sehr späten Gene durch eine α -Amanitin resistente RNA-Polymerase transkribiert werden (Grula et al., 1981). Diese Polymerase besteht aus einem Komplex von vier viruskodierten Untereinheiten (Yang et al., 1991; Guarino et al., 1998 a). Die am besten charakterisierte Untereinheit ist der virale „late expression factor 4“ (LEF-4). Wenn die viruskodierte RNA-Polymerase die Transkription ab der späten Infektionsphase übernimmt, sollten ihre Untereinheiten, wie u.a. LEF-4, spät in der Infektion vorhanden sein. Zur Untersuchung dieser Annahme wurden zunächst Western Blot-Analysen von Proteinextrakten aus AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen durchgeführt (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass LEF-4 ab 8 h p.i. detektierbar war. Die Proteinmenge von LEF-4 nahm in den späten Phasen der Infektion zu und blieb von 16 bis 72 h p.i. annähernd gleich groß. Die TBP-Menge in denselben Proteinextrakten ist vergleichend dargestellt (Abb. 17).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abnahme von TBP 48 h p.i. nicht mit einer Abnahme der RNA-Polymerase-Untereinheit LEF-4 korreliert. Kolokalisierungsstudien von TBP und LEF-4 konnten nicht durchgeführt werden, da das polyklonale anti-LEF-4-Kaninchenserum nur unspezifische Signale in indirekten Immunfluoreszenzexperimenten zeigte.

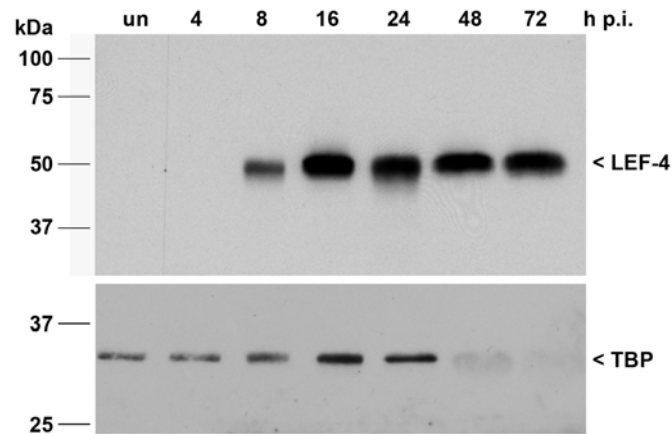


Abb. 17: Expression von LEF-4 in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Aus 6×10^5 uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 10 μ l Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von LEF-4 erfolgte mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchen-serum (oben). Zum Vergleich ist der Nachweis von TBP mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchen-serum aus denselben Zellextrakten dargestellt (unten). Die Pfeile markieren die spezifischen Proteinsignale.

1.3. Zusammenfassung der Studien über TBP und die RNA-Polymerasen

Entgegen der berichteten Expressionsabnahme der meisten zellulären Gene während des baculoviralen Infektionsverlaufs (Carstens et al., 1979; Wood, 1980) zeigten die hier vorgestellten Studien einen Anstieg der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Insektenzellen. In Sf21-Zellen war eine TBP-Zunahme um den Faktor 4 ab 16 h p.i. bis in die sehr späte Infektionsphase 72 h p.i. zu beobachten. In TN-368-Zellen nahm die Menge an TBP ab 8 h p.i. bis zu einem Signalhöhepunkt bei 16 h p.i. um das 4-fache zu, bevor ab 24 h p.i. eine leichte und ab 48 h p.i. eine deutliche Abnahme des TBP-Proteins zu verzeichnen war. Die beobachtete Abnahme von TBP in TN-368-Zellen ab 48 h p.i. korrelierte nicht mit einer Abnahme der viralen RNA-Polymerase-Untereinheit LEF-4.

Northern Blot-Analysen ergaben, dass die Zunahme des TBP-Proteins in der späten Phase der Baculovirusinfektion nicht von einer verstärkten Transkription des *tbp*-Gens herrührt.

Lokalisierungsstudien zeigten ab 4 h p.i. eine TBP-Umstrukturierung von einem granulären Färbemuster im gesamten Zellkern in distinkte Kerndomänen, die zu größeren Kernstrukturen in der späten baculoviralen Infektionsphase fusionierten, so dass TBP ab 16 h p.i. in einer großen Struktur im Zellkern lokalisierte. Dabei kolokalisierte TBP mit und in Abhängigkeit von der Entstehung viraler DNA-Replikationszentren. Der Nachweis einer Kolokalisierung von TBP und der zellulären RNAP II in viralen Replikationszentren wurde nur bis 8 h p.i. beobachtet.

2. Studien zur Stabilität von TBP und zum Einfluss der Translationshemmung auf die TBP-Lokalisierung

Zur Untersuchung der Rolle der Proteinneusynthese für die Expression und Lokalisierung von TBP während der AcMNPV-Infektion, wurden Analysen unter Verwendung des Ribosomeninhibitors Cycloheximid (CHX) durchgeführt. Es wurde die Stabilität von TBP und anschließend der Einfluss der Translationshemmung auf die TBP-Lokalisierung im Infektionsverlauf untersucht.

2.1. TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen nach Hemmung der Translation

Zunächst wurde die Wirksamkeit von CHX auf die Proteinneusynthese getestet, indem die Expression viraler Proteine nach der Infektion überprüft wurde. Die erfolgreiche Infektion zeigte sich durch den Nachweis der Polyederentstehung. Als Anhaltspunkt der zu verwendenden CHX-Konzentration dienten frühere Studien, bei denen 1 mg/ml CHX als ausreichend beschrieben worden ist, um die Translation in Sf21-Zellen zu inhibieren (Krappa et al., 1995).

Zur Überprüfung der publizierten CHX-Konzentration wurden für die vorliegende Arbeit Sf21-Zellen und TN-368-Zellen mit AcMNPV infiziert und 8 h p.i. mit 1 mg/ml CHX behandelt. Bis 72 h p.i. konnten unter CHX-Einfluss keine viralen Einschlusskörper in Phasenkontrastaufnahmen festgestellt werden, wohingegen in den meisten unbehandelten Zellen Polyeder im Zellkern nachgewiesen wurden (exemplarisch für TN-368-Zellen in Abb. 19 A dargestellt). Daher wurde die eingesetzte CHX-Menge als ausreichend betrachtet, um die Translation zu hemmen.

Um Hinweise auf die Stabilität des TBP-Proteins zu erhalten, wurden uninfizierte Sf21-Zellen ohne bzw. mit 1 mg/ml CHX inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Der Vergleich von translationsinhibierten und nicht inhibierten Zellen zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied der TBP-Signalintensität in Western Blot-Analysen (Abb. 18 A). In AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen war ohne CHX-Behandlung der deutliche Anstieg der TBP-Proteinmenge zu beobachten (Ergebnisteil 1.1.1., Abb. 18 B links). Nach der Hemmung der Translation 4 h p.i. konnte in Sf21-Zellen ein stark reduzierter TBP-Anstieg bis in die sehr späte Infektionsphase nachgewiesen werden (Abb. 18 B rechts).

Dieser reduzierte, aber immer noch vorhandene Anstieg der TBP-Proteinmenge könnte auf einer nicht vollständigen Translationsinhibition in Sf21-Zellen beruhen.

Dieses in den uninfizierten Sf21-Zellen erhaltene Ergebnis zeigt an, dass auch bei starker Hemmung der Proteinneusynthese keine Reduktion der TBP-Proteinmenge nachweisbar ist. In anderen Experimenten war die TBP-Proteinmenge in uninfizierten Sf21-Zellen auch 96 Stunden nach CHX-Behandlung noch erhalten (Daten nicht gezeigt). Somit scheint das TBP-Protein über eine große Stabilität zu verfügen, da sonst eine Abnahme von TBP nach drei bis vier Tagen unter CHX-Einfluß zu erwarten wäre.

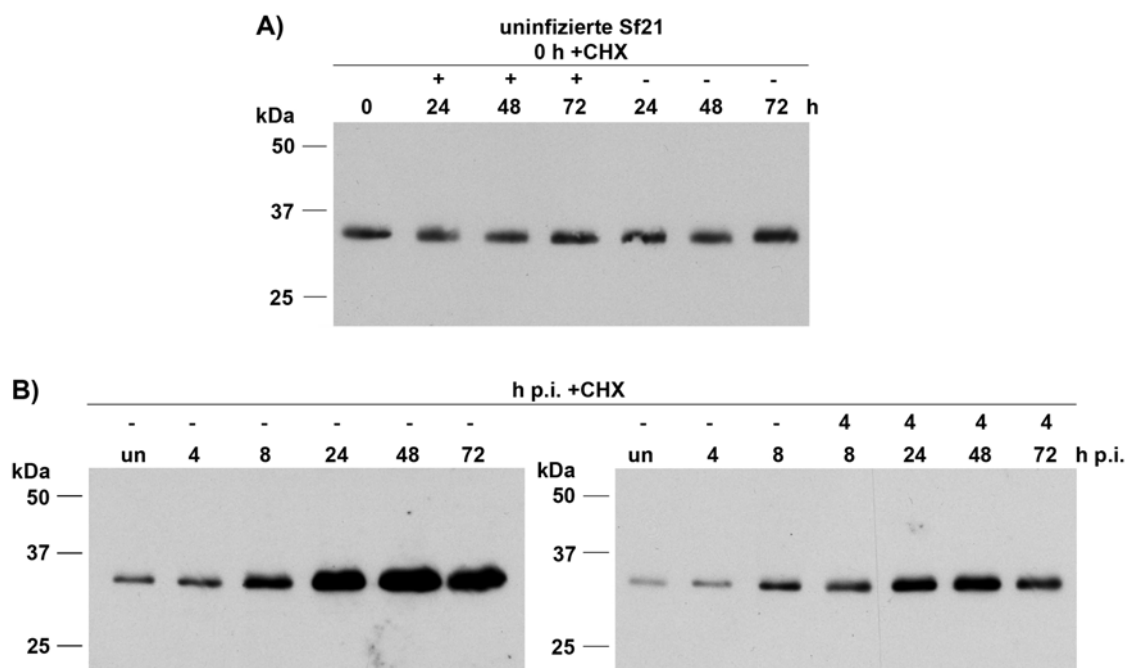


Abb. 18: Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Expression in Sf21-Zellen

A) 2×10^6 uninfizierte Sf21-Zellen wurden mit 1 mg/ml CHX behandelt (+) oder blieben unbehandelt (-). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. **B)** 2×10^6 uninfizierte und mit AcMNPV infizierte Sf21-Zellen wurden 4 h p.i. mit 1 mg/ml CHX behandelt (4) oder blieben unbehandelt (-). Es erfolgte 4, 8, 24, 48 und 72 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (**A**) oder mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (**B**) nachgewiesen. Die Proteinstandards sind jeweils links angegeben.

2.2. Expression von TBP in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen nach Inhibition der Translation

Zur Untersuchung der Wirkung der Translationshemmung in der sehr späten Phase der AcMNPV-Infektion in der Zelllinie TN-368, wurden die Zellen ab 8 h p.i. entweder mit 1 mg/ml oder ohne CHX inkubiert. Dabei zeigten 48 h p.i. in Phasenkontrastaufnahmen

nahezu alle unbehandelten Zellen eine deutliche Polyederbildung (Abb. 19 A). Zum Zeitpunkt 72 h p.i. waren schon einige TN-368-Zellen lysiert und es wurden die ersten Polyeder aus den Zellen freigesetzt. Die Wirkung von CHX führte dazu, dass bis 72 h p.i. die Bildung viraler Einschlusskörper komplett inhibiert wurde (Abb. 19 A).

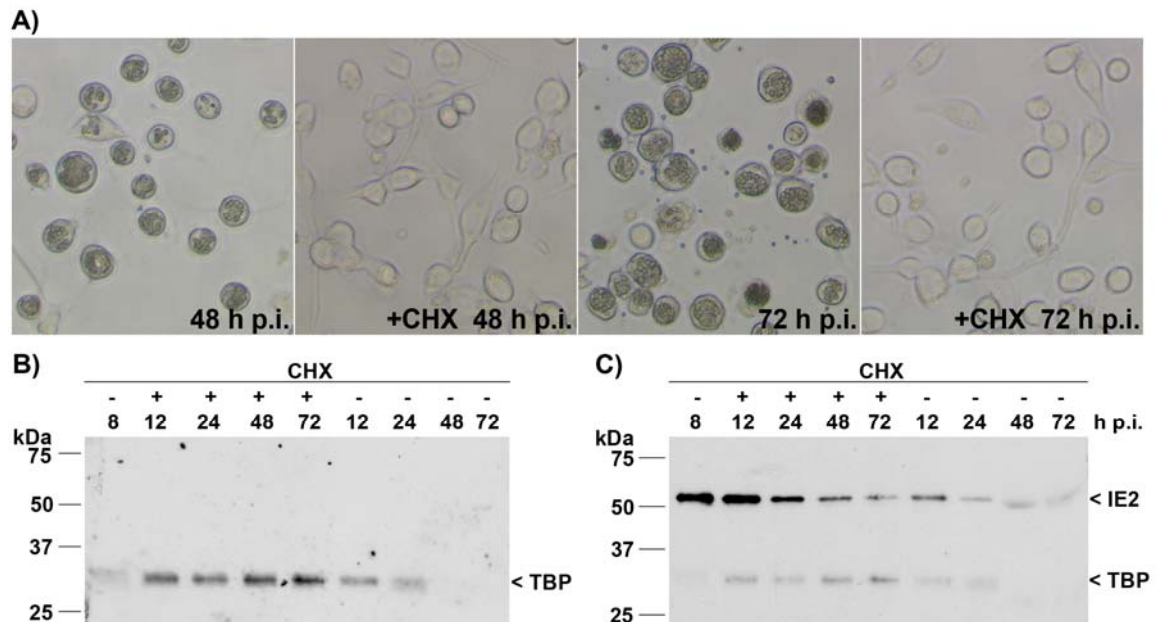


Abb. 19: TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen bei Hemmung der Translation 8 h p.i.

A) AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden entweder nicht mit CHX inkubiert oder 8 h p.i. mit 1 mg/ml CHX (+CHX) behandelt. Es sind Phasenkontrast-Aufnahmen 48 und 72 h p.i. dargestellt. B, C) 6×10^5 TN-368-Zellen wurden mit AcMNPV infiziert und 8 h p.i. mit 1 mg/ml CHX behandelt (+) oder blieben unbehandelt (-). Es erfolgte 8, 12, 24, 48 und 72 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. Pro Spur wurden 10 μ l Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum nachgewiesen. In C) ist eine Redetektion der Membran aus B) mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum gezeigt. Die Proteinstandards sind jeweils links angegeben.

Der Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Expression auf Proteinebene wurde mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Dazu wurden TN-368-Zellen mit AcMNPV infiziert und ab 8 h p.i. in 1 mg/ml CHX-enthaltenden Insektenzellmedium kultiviert. 8, 12, 24, 48 und 72 h p.i. erfolgte die Präparation von nukleären Detergenzextrakten. In unbehandelten TN-368-Zellen sank ab 48 h p.i. die TBP-Proteinmenge unter die Nachweisgrenze (Ergebnisteil 1.1.2.). Interessanterweise konnte eine deutliche Verzögerung des TBP-Abbaus in CHX-behandelten TN-368-Zellen beobachtet werden. In diesen Zellen war bis 72 h p.i. eine deutliche TBP-Bande zu erkennen (Abb. 19 B).

Zum Vergleich wurde die CHX-Wirkung in TN-368-Zellen auf das baculovirale IE2-Protein untersucht, von dem bekannt ist, dass es nach Zugabe hoher CHX-Konzentrationen verstärkt nachweisbar ist (Ross und Guarino, 1997). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass

IE2 in TN-368-Zellen von 2 bis 12 h p.i. deutlich auf Proteinebene detektierbar ist, 16 h p.i. signifikant an Signalintensität verliert und 24 h p.i. kaum noch nachzuweisen ist (Murges et al., 2001). Daher wurde die Nitrozellulosemembran aus Abb. 19 B mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum redetektiert. Auch für IE2 zeigte sich unter der Wirkung von CHX ein deutlich verlangsamter Abbau während der späten Infektionsphase, wodurch IE2 ebenfalls bis 72 h p.i. nachzuweisen war (Abb. 19 C). Dieses Ergebnis korreliert mit früheren Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass in Sf21-Zellen unter dem Einfluss von CHX ein reduzierter IE2-Abbau in der späten Infektionsphase stattfindet (Krappa et al., 1995).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl der IE2- als auch der TBP-Abbau von der Synthese anderer Faktoren abhängig sind und somit einem aktiven Abbaumechanismus unterliegen.

Um Hinweise zu erhalten, zu welchem Zeitpunkt der aktive Abbaumechanismus durch CHX aufgehoben werden kann, wurde die Proteinsynthese vergleichend zu einem frühen und späten Zeitpunkt der AcMNPV-Infektion blockiert. Dazu wurden TN-368-Zellen mit AcMNPV infiziert und 1 bzw. 12 h p.i. ohne und mit 1 mg/ml CHX behandelt. Während in unbehandelten Zellen der TBP-Proteinspiegel in Western Blot-Studien nach 24 h p.i. stark absank, konnte nach der Zugabe von CHX 1 h p.i. eine Stabilisierung von TBP bis 72 h p.i. nachgewiesen werden (Abb. 20). Erfolgte die Translationsinhibition erst 12 h p.i., war eine signifikant angestiegene TBP-Menge zu beobachten, die bis 72 h p.i. erhalten blieb (Abb. 20).

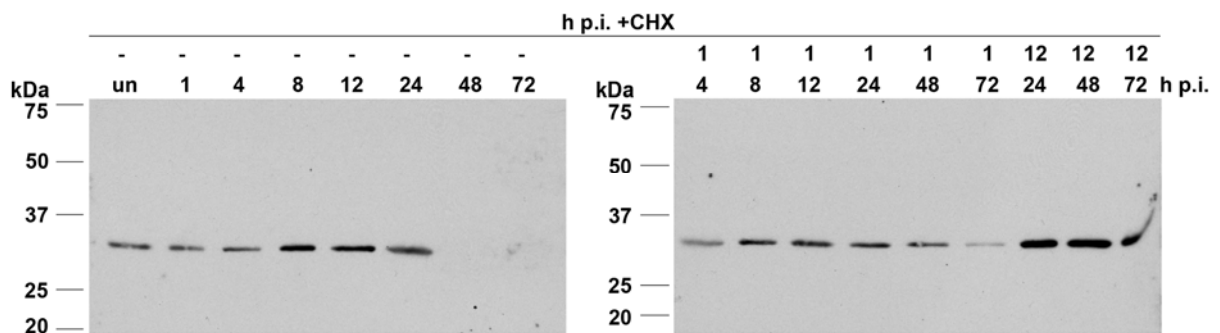


Abb. 20: Analyse der TBP-Expression in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen bei Hemmung der Translation zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion

6×10^5 uninfizierte und mit AcMNPV infizierte TN-368-Zellen wurden 1 h p.i. oder 12 h p.i. mit 1 mg/ml CHX behandelt (1 bzw. 12) oder blieben unbehandelt (-). Es erfolgte 1, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. Pro Spur wurden 10 μ l TN-368-Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum nachgewiesen. Die Proteinstandards sind jeweils links angegeben.

Dies zeigte einerseits, dass der Anstieg von TBP in der späten Infektionsphase von einer Proteinneusynthese während der Virusinfektion abhängig ist. Andererseits wurde deutlich, dass eine Translationsinhibition sowohl zu einem frühen als auch zu einem späten Infektionszeitpunkt den TBP-Abbau in der sehr späten Phase der Infektion in TN-368-Zellen hemmt. Somit bestätigt dieses Ergebnis den oben beschriebenen verzögerten Abbau von TBP unter Einfluss von CHX und unterstützt die Vermutung, dass TBP in der sehr späten Phase der AcMNPV-Infektion in TN-368-Zellen in Abhängigkeit von neu synthetisierten Proteinen, und somit aktiv, abgebaut wird.

2.3. Einfluss der Translationshemmung auf die TBP-Lokalisierung in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

TN-368-Zellen wurden mit AcMNPV infiziert und kurz nach der Infektion (1 h p.i.), während der frühen Phase der Infektion (4 h p.i.) oder beim Einsetzen der späten Infektionsphase (7 h p.i.) mit 1 mg/ml CHX behandelt. Durch Phasenkontrastaufnahmen wurde die Translationshemmung anhand der Polyederbildung visualisiert. Dabei zeigte sich, dass bis 24 h p.i. keine viralen Einschlusskörper unter CHX-Einfluss gebildet wurden, wohingegen in den meisten unbehandelten Zellen Polyeder im Zellkern festgestellt wurden (Abb. 21 A).

Unter den gleichen Bedingungen mit 1 mg/ml bzw. ohne CHX wurden Koloalisierungsstudien von TBP und BrdU-markierten DNA-Replikationszentren durchgeführt (Abb. 21 B, C). Die Zellen wurden 4, 8 und 24 h p.i. fixiert und konfokale mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Unbehandelte TN-368-Zellen zeigten die zuvor in den Ergebnisteilen 1.2.1. und 1.2.2. beschriebene Koloalisierung von DNA-Replikationszentren und TBP (Abb. 21 B links). Nach Hemmung der Translation durch CHX 1 h p.i. wurde sowohl die Entstehung der TBP-Kerndomänen, als auch die virale DNA-Synthese komplett blockiert (Abb. 21 B rechts). Wurde die Translation erst 4 h p.i. inhibiert, so waren sowohl 8 als auch 24 h p.i. distinkte TBP-Kerndomänen zu beobachten, die etwas größer waren als die Kernstrukturen 4 h p.i. in unbehandelten Zellen (Abb. 21 C links). 8 h p.i. war noch eine leichte Färbung der mit TBP koloalisierenden Replikationszentren auszumachen, die 24 h p.i. aber nicht mehr nachweisbar war (Abb. 21 C links). Dies ist auf die starke Inhibition der Translation und der damit einhergehenden Blockierung der viralen DNA-Synthese zu erklären. Dadurch war in den BrdU-Pulsmarkierungsexperimenten bei Zugabe von BrdU eine Stunde vor der Zellfixierung 24 h p.i. keine DNA-Neusynthese und damit auch kein Einbau von BrdU mehr möglich.

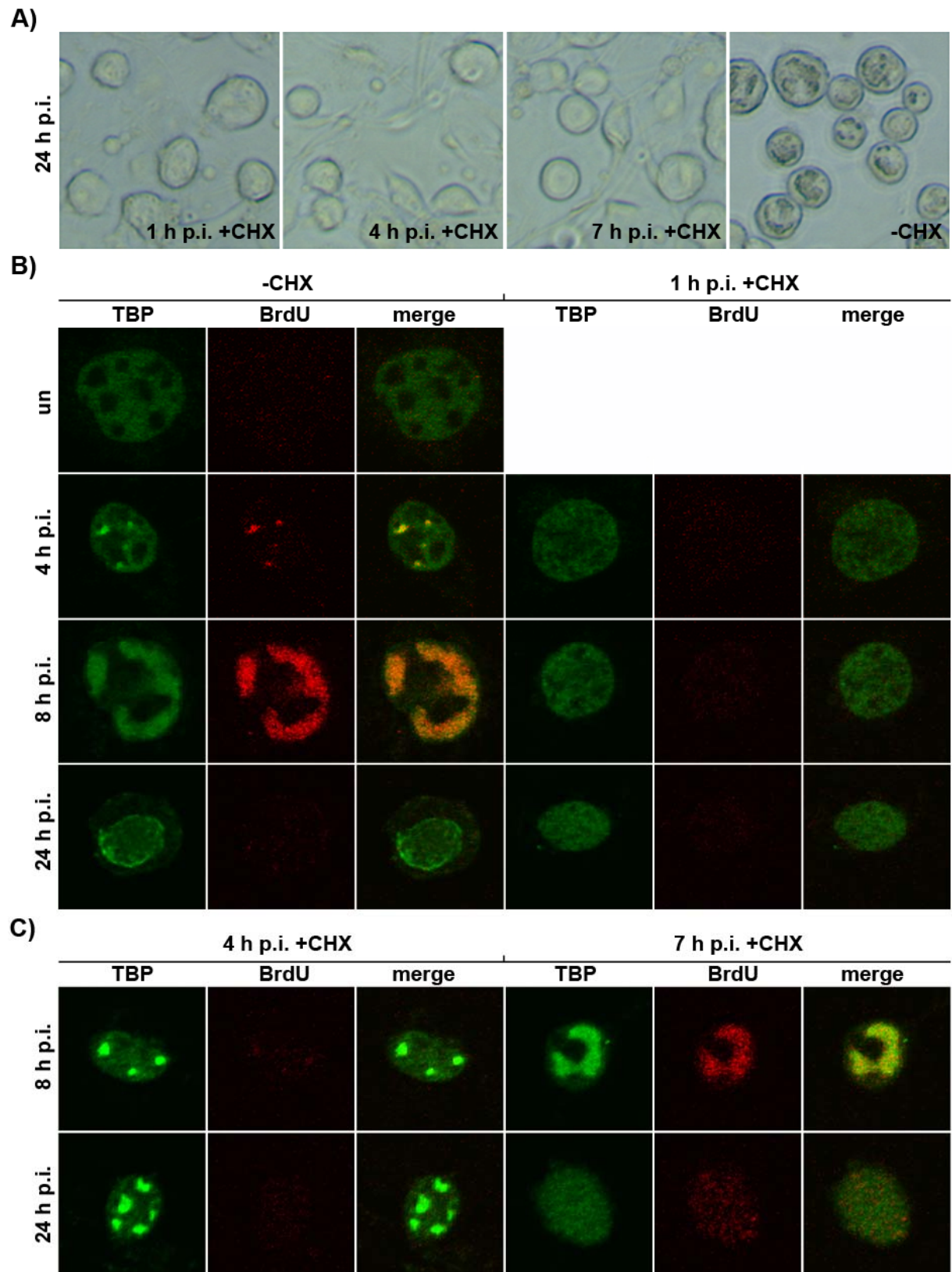


Abb. 21: Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Relokalisierung im baculoviralen Infektionsverlauf

Abb. 21: Einfluss der Translationsinhibition auf die TBP-Relokalisierung im baculoviralen Infektionsverlauf (S. 81)

A) AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden 1, 4 oder 7 h p.i. ohne (-CHX) bzw. mit 1 mg/ml des Translationsinhibitors Cycloheximid (+CHX) behandelt. Es sind Phasenkontrast-Aufnahmen 24 h p.i. dargestellt. **B, C)** Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden entweder nicht mit CHX (**B links**) oder 1 h p.i. (**B rechts**), 4 h p.i. (**C links**) bzw. 7 h p.i. (**C rechts**) mit 1 mg/ml CHX behandelt. Die Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung in 2% Paraformaldehyd mit BrdU markiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 4, 8 und 24 h p.i.. Zum Nachweis von TBP wurden die Zellen mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum (**B**) bzw. polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum (**C**) und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU-Antikörper (Maus) inkubiert. TBP wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und BrdU mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) in konfokalen Aufnahmen sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Signale einer Zelle ist jeweils rechts dargestellt (merge).

Wurde die Translation erst 7 h p.i. inhibiert, konnten 8 h p.i., wie in unbehandelten TN-368-Zellen, sowohl eine TBP-Umstrukturierung als auch eine kolokalisierende Replikationszentrenbildung nachgewiesen werden (Abb. 21 C rechts). In diesem Fall waren 24 h p.i. granuläre Färbemuster der TBP- und der BrdU-Färbungen im gesamten Zellkern auszumachen.

Die hier beschriebenen Inhibitorstudien mit CHX bestätigen somit die mit dem Replikationsinhibitor Aphidicolin erzielten Ergebnisse (Ergebnisteil 1.2.2.), wonach die Relokalisierung von TBP direkt an die Ausbildung von viralen DNA-Replikationszentren gekoppelt ist, die wiederum von der Synthese früher viraler Proteine abhängig ist.

3. Kolokalisierungsstudien von TBP, IE2 und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass in TN-368-Zellen die Menge des TBP-Proteins durch einen aktiven Abbaumechanismus in der sehr späten baculoviralen Infektionsphase reduziert wird. Ein möglicher Weg wäre die Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Eine Voraussetzung für einen Abbau von TBP durch proteasomale Degradation ist eine Assoziation von TBP mit konjugiertem Ubiquitin. Daher wurden Kolokalisierungsstudien von TBP mit konjugiertem Ubiquitin durchgeführt.

Als Vergleich wurde die Kolokalisierung von konjugiertem Ubiquitin mit dem frühen viralen IE2-Protein untersucht. Untersuchungen des BmNPV IE2-Proteins haben gezeigt, dass es, wie andere Mitglieder der Zinkfinger-Proteinfamilie, mit einem „RING“-Finger-Motiv als Ubiquitin-Ligase (E3-Enzym) fungieren kann (Imai et al., 2003). Des Weiteren wurde beschrieben, dass in der frühen Infektionsphase eine verstärkte Akkumulation von IE2 in Kerndomänen vorliegt, wenn die Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG132 inkubiert werden, oder wenn die E3-Ligase-Aktivität von IE2 deletiert wird. Somit gibt es Hinweise, dass IE2 durch den Ubiquitin-Proteasomen-Weg degradiert wird, was durch eine Auto-Ubiquitinierung gesteuert sein könnte (Imai et al., 2005).

Wir beobachteten, dass AcMNPV IE2 in TN-368-Zellen von 2 bis 8 h p.i. in feinen, hellen und punktierten Kernstrukturen nachzuweisen ist, während es 16 und 24 h p.i. in fadenförmige Aggregate umstrukturiert wird, deren Anzahl, im Vergleich zum Auftreten der zuvor nachweisbaren nukleären Domänen, reduziert ist. Es wurde spekuliert, dass es sich bei diesen fadenförmigen Aggregaten um eine Akkumulation von IE2-Spaltprodukten handeln könnte (Quadt, 2000; Murgess et al., 2001). Insgesamt legen diese Erkenntnisse nahe, dass IE2 mit konjugiertem Ubiquitin kolokalisiert.

3.1. Kolokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Zunächst wurde die Lokalisierung von IE2 und Ubiquitin während der AcMNPV-Infektion überprüft. Dazu wurden TN-368-Zellen 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. fixiert und mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und mit einem monoklonalem Antikörper inkubiert, der spezifisch konjugiertes, aber kein freies monomeres Ubiquitin erkennt. In uninfizierten Zellen war

konjugiertes Ubiquitin hauptsächlich in teilweise großen Aggregaten im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 22).

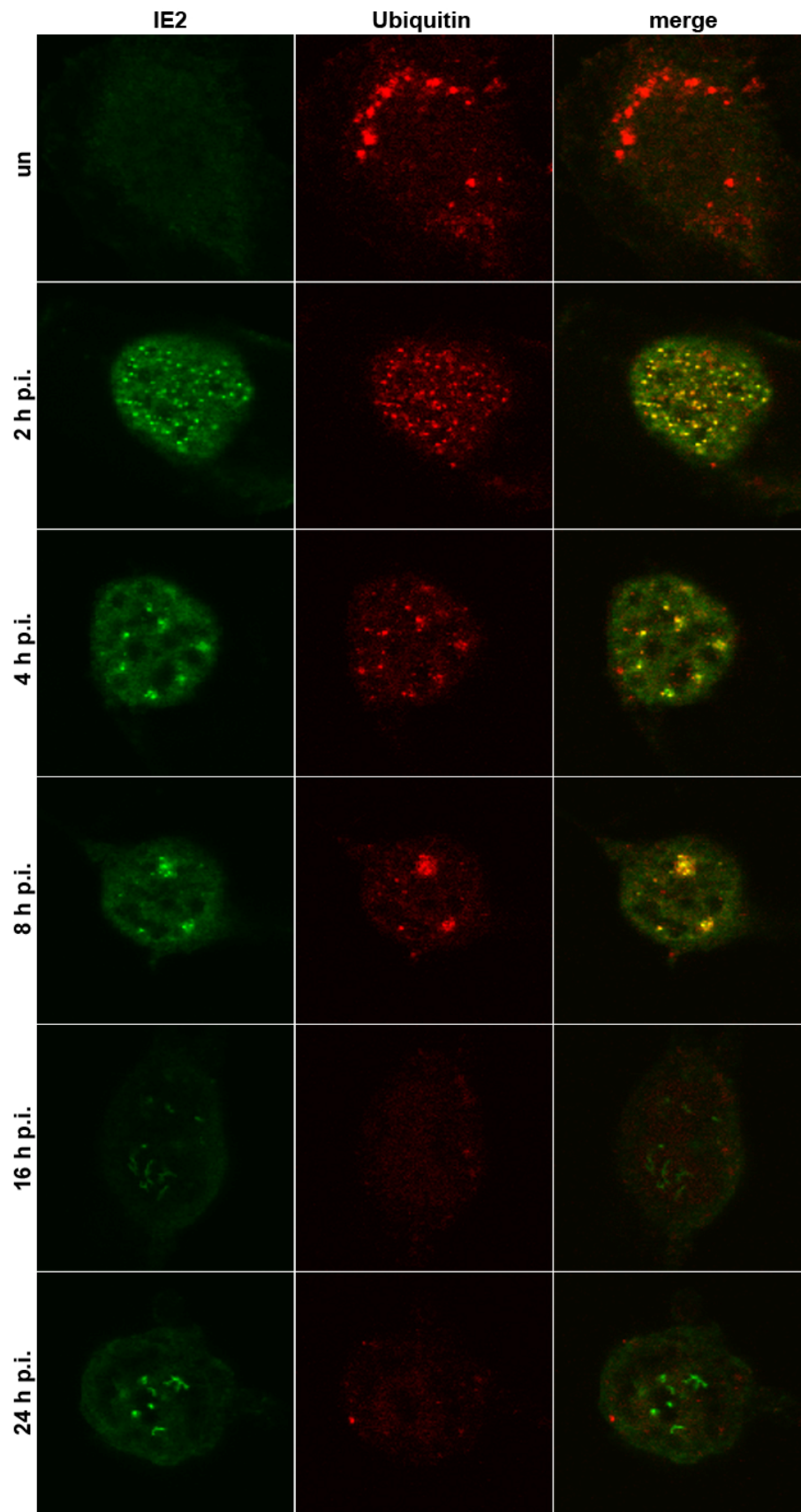


Abb. 22: Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin im baculoviralen Infektionsverlauf

Abb. 22: Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin im baculoviralen Infektionsverlauf (S. 84)

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. IE2 wurde mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und Ubiquitin mit für konjugiertes Ubiquitin spezifischem monoklonalem Antikörper (FK2) (Maus) nachgewiesen. Dabei wurde IE2 mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und konjugiertes Ubiquitin mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) in konfokalen Aufnahmen visualisiert. Die Überlagerung der Signale einer Zelle ist dargestellt (merge).

Ab 2 h p.i. fand eine Umstrukturierung von konjugiertem Ubiquitin statt, so dass es zu diesem sehr frühen Infektionszeitpunkt zumeist in feinen punktierten Strukturen, die im ganzen Kern verteilt waren, zu finden war (Abb. 22). Diese Strukturen kolokalisiert zum größten Teil mit den punktierten IE2-Strukturen, wobei auch einzelne nicht kolokalisierende Ubiquitinpunkte vorhanden waren. Ab 4 h p.i. kam es bereits in einem Teil der Zellen zu einer Konzentration der punktierten IE2- und Ubiquitin-Strukturen in denselben nukleären Bereichen, so dass die Mehrzahl der Kerndomänen beider Proteine weiterhin kolokalisierte. Es gab aber auch zu diesem Zeitpunkt Domänen, in denen nur Ubiquitin zu finden war. Bis 8 h p.i. akkumulierten IE2 und konjugiertes Ubiquitin, weiterhin größtenteils Kolokalisierung demonstrierend, in größer werdenden und an Zahl abnehmenden Kerndomänen (Abb. 22). In der späten Phase der Infektion ab 16 h p.i. kam es zu der Umwandlung der punktierten IE2-Strukturen in fadenförmige nukleäre Bereiche, die bereits beschrieben wurde (Murges et al., 2001). Konjugiertes Ubiquitin hingegen war nur noch als schwach granuläres Färbemuster nachweisbar, mit vereinzelt helleren Bereichen im Zytoplasma. Eine Kolokalisierung von Ubiquitin und den fadenförmigen IE2-Strukturen war in der späten Infektionsphase nicht mehr auszumachen.

Diese Studien demonstrieren eine Assoziation von IE2-Domänen mit konjugiertem Ubiquitin in der frühen baculoviralen Infektionsphase. Dies korreliert mit der postulierten Funktion von IE2 als E3-Ligase und kann somit als immunhistochemische Bestätigung für die publizierten *in vitro*-Studien (Imai et al., 2003) betrachtet werden.

3.2. Kolokalisierungsstudien von TBP und konjugiertem Ubiquitin im AcMNPV-Infektionsverlauf

Zur Untersuchung, ob TBP und konjugiertes Ubiquitin kolokalisieren, wurden in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen TBP und konjugiertes Ubiquitin angefärbt (Abb. 23). Die TBP-Umstrukturierung setzte ab 4 h p.i. ein (s. auch Ergebnisteil 1.2.2.). Dabei zeigten die TBP-Domänen eine Überlagerung mit den sich konzentrierenden Ubiquitin-Kernbereichen (Abb. 23). Nach 8 h p.i. kolokalisierten punktierte Ubiquitin-Strukturen mit größer werdenden

TBP-Kerndomänen, wobei konjugiertes Ubiquitin auch in anderen Bereichen des Kerns und als Aggregate im Zytoplasma vorlag.

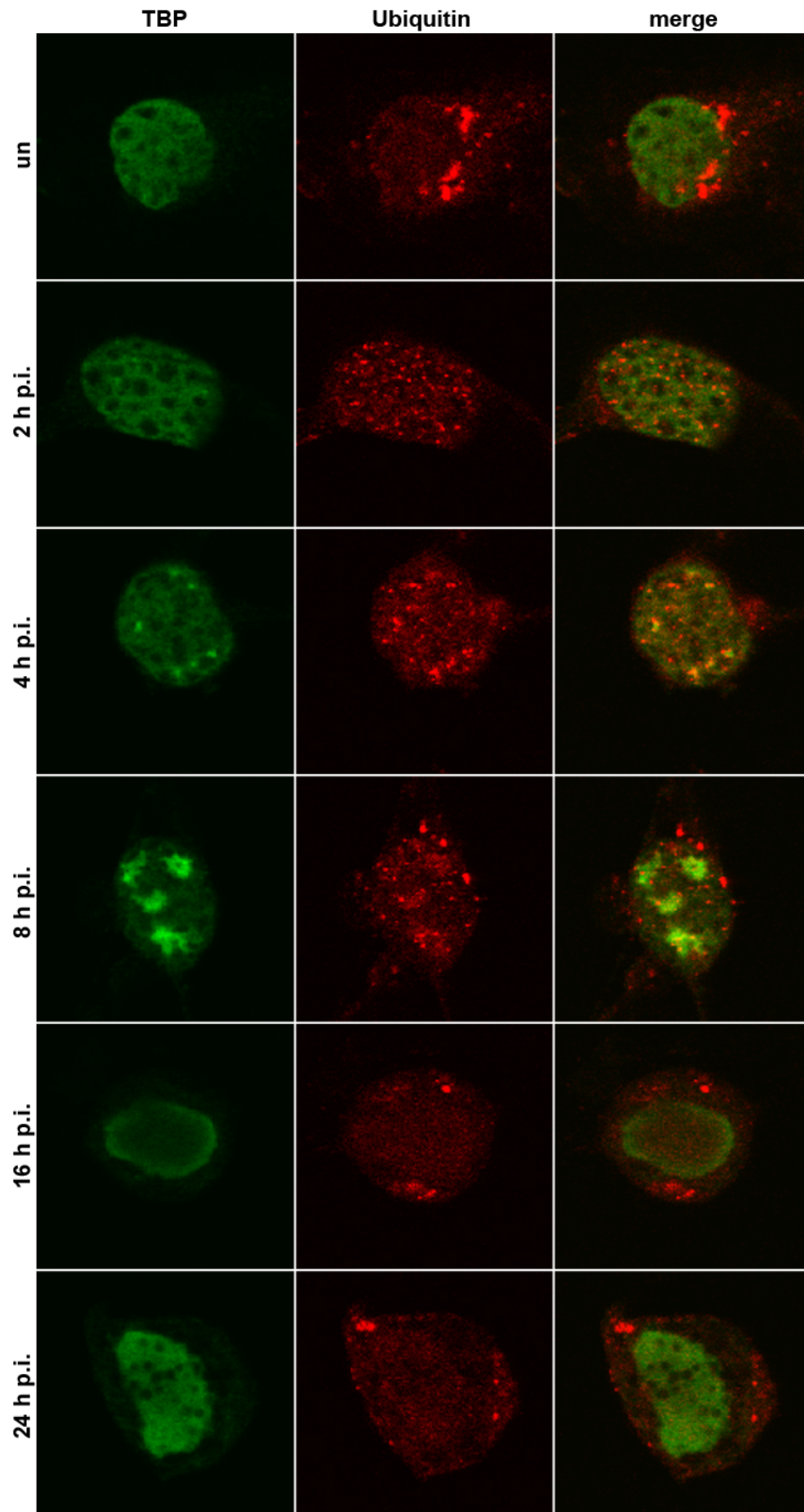


Abb. 23: Kolokalisierungsstudien von TBP und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Abb. 23: Kolokalisierungsstudien von TBP und konjugiertem Ubiquitin in AcMNPV-infizierten Insektenzellen (S. 86)

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von TBP wurden die Zellen mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum und zum Nachweis von Ubiquitin mit für konjugiertes Ubiquitin spezifischem monoklonalem Antikörper (FK2) (Maus) inkubiert. TBP wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und konjugiertes Ubiquitin mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der konfokalen Mikroskopsignale einer Zelle ist dargestellt (merge).

Ab der späten Infektionsphase fusionierten die TBP-Domänen zu einer großen Kernstruktur, während konjugiertes Ubiquitin nur noch schwach granulär oder in helleren zytoplasmatischen Bereichen zu sehen war (Abb. 23). Eine Assoziation in den gleichen Zellbereichen konnte in dieser Phase nicht mehr ausgemacht werden.

TBP kolokalisiert im baculoviralen Infektionsverlauf mit viralen DNA-Replikationszentren (Ergebnisteile 1.2.1. und 1.2.2.), wobei TBP ein granuläres Färbemuster zeigt. Konjugiertes Ubiquitin lokalisiert in einem punktierten Muster in den Replikationszentren, weshalb unklar ist, ob eine direkte Assoziation mit TBP besteht. IE2 liegt ebenfalls in punktierten Strukturen in Replikationszentren vor (Mainz et al., 2002). Daher resultiert die Kolokalisierung der Proteine in den Bereichen replizierender viraler DNA möglicherweise auf einer Assoziation von IE2 und konjugiertem Ubiquitin.

Somit konnte durch diese Lokalisierungsstudien kein direkter Zusammenhang zwischen dem TBP-Abbau in der sehr späten Infektionsphase in TN-368-Zellen und dem Ubiquitin-Proteasomen-Weg aufgezeigt werden.

3.3. Kolokalisierung von TBP und IE2 in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen

Um die TBP-Lokalisierung im Zusammenhang zur IE2-Lokalisierung im Infektionsverlauf zu sehen, wurden Kolokalisierungsstudien für IE2 und TBP angefertigt. In vorausgehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bestimmte IE2-Domänen mit baculoviralen DNA-Replikationszentren kolokalisieren sobald virale DNA-Replikation nachweisbar ist (Mainz et al., 2002). Auch nach den zuvor beschriebenen Lokalisierungsstudien der vorliegenden Arbeit war zu vermuten, dass TBP und IE2 zumindest in der frühen Infektionsphase in denselben Kernbereichen zu finden sein sollten. Zum Nachweis von IE2 in den konfokalen Analysen wurde in diesem Fall ein polyklonales anti-IE2 Mausserum eingesetzt. Beide Proteine zeigten die in diesem Kapitel zuvor beschriebenen charakteristischen Färbemuster.

Es wurde deutlich, dass fast alle nachweisbaren TBP-Kerndomänen 4 h p.i. mit den punktierten und akkumulierenden IE2-Strukturen kolokalisierten (Abb. 24). Auch 8 h p.i. war diese Assoziation der sich vergrößernden TBP-Domänen mit den IE2-Kerndomänen

festzustellen, wobei es vereinzelte feine IE2-Signale gab, die nicht mit TBP kolokalisierten (Abb. 24).

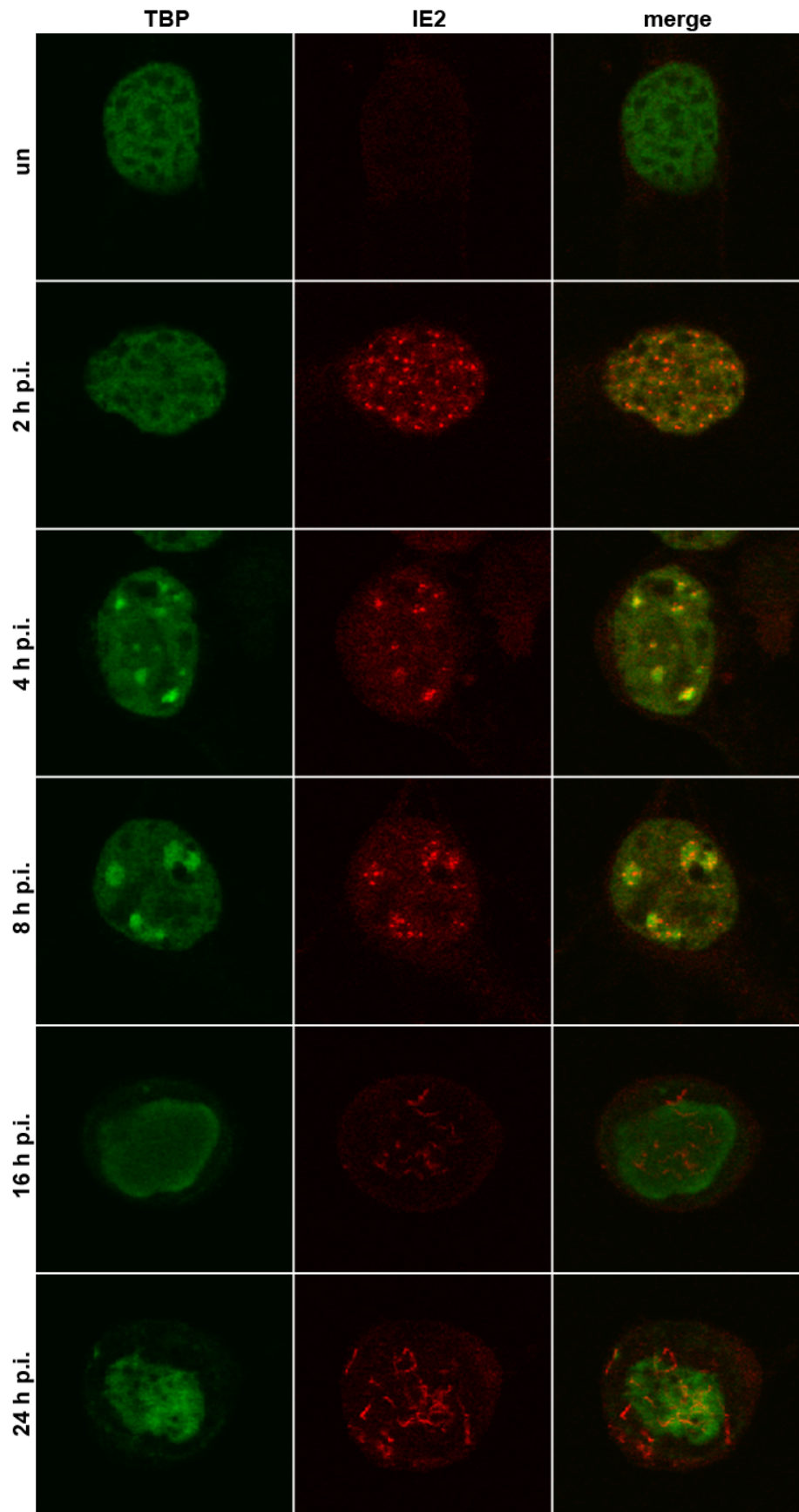


Abb. 24: Kolokalisierungstudien von TBP und IE2 im baculoviralen Infektionsverlauf

Abb. 24: Kolokalisierungsstudien von TBP und IE2 im baculoviralen Infektionsverlauf (S. 88)

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. TBP wurde mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3889) Kaninchenserum und IE2 mit polyklonalem anti-IE2-Mausserum nachgewiesen. Dabei wurde TBP mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und IE2 mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Die Überlagerung der Signale einer Zelle in konfokalen Mikroskopaufnahmen ist dargestellt (merge).

In der späten Infektionsphase ab 16 h p.i. waren die langen fadenförmigen IE2-Strukturen im gesamten Kern verteilt nachzuweisen und zeigten nicht länger eine Assoziation mit der großen TBP-Kerndomäne (Abb. 24).

Somit konnte gezeigt werden, dass in der frühen Phase der AcMNPV-Infektion eine Kolokalisierung der TBP-Domänen mit den punktierten IE2-Strukturen besteht. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Assoziation von Ubiquitin mit TBP-Strukturen auf die Kolokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in gemeinsamen Domänen zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Lokalisierungsstudien kann allerdings eine proteasomale Degradation von TBP auch während der späten Virusinfektion in TN-368-Zellen nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

3.4. Analysen des Einflusses viralen Ubiquitins auf die Lokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin im AcMNPV-Infektionsverlauf

AcMNPV kodiert für ein modifiziertes Ubiquitin, von dem gezeigt wurde, dass es nicht in der Lage ist, Polyubiquitinierungen an potentiell abzubauenen Proteinen einzugehen (Guarino, 1990; Haas et al., 1996). Über die Funktion des viralen Ubiquitins für die baculovirale Infektion wurde vermutet, dass es als Kettenterminator fungieren könnte (Haas et al., 1996). Auf diese Weise könnten Proteine für das zelluläre Degradationssystem unkenntlich gemacht werden. Es wäre denkbar, dass auch TBP durch das virale Ubiquitin während der späten Infektionsphase stabilisiert wird, und dadurch in TN-368-Zellen zumindest bis 24 h p.i. einen Proteinanstieg zeigt.

Um zu untersuchen, ob virales Ubiquitin einen stabilisierenden Einfluss auf TBP ausübt, wurden Studien mit AcMNPV-Mutanten durchgeführt, die Mutationen im v-ubi-Gen enthalten. In einen Fall liegt eine Leserasterverschiebung („frame shift“ = v-ubi FS) im v-ubi-Gen vor (Reilly und Guarino, 1996), im anderen Fall eine Substitution der drei C-terminalen Codons (v-ubi RGG), die jeweils für die Aminosäure Alanin kodieren. In beiden Fällen sollte das virale Ubiquitin seine Funktion im Ubiquitin-Proteasom-System verloren haben (persönliche Mitteilung von L. Guarino). Expressionsanalysen zeigten allerdings keinen Einfluss der v-ubi-Mutationen auf die Expression von TBP in der späten

Infektionsphase (Voß, 2003; Günther, 2005). Es wurde außerdem keine Veränderung der IE2-Expression festgestellt (Günther, 2005).

Um eine mögliche Wirkung der v-ubi-Mutanten auf die Lokalisierung von konjugiertem Ubiquitin und IE2 zu untersuchen, wurden Kolokalisierungsstudien durchgeführt. Dazu wurden TN-368-Zellen mit Wildtyp (wt) AcMNPV oder mit den AcMNPV-Mutanten v-ubi FS oder v-ubi RGG infiziert und 4, 8, 16 oder 24 h p.i. fixiert. In der frühen Infektionsphase bis 8 h p.i. waren weder für die IE2-Verteilung noch für die Lokalisierung von konjugiertem Ubiquitin Unterschiede zwischen der wt AcMNPV-Infektion und der Infektion mit den AcMNPV-Mutanten auszumachen (Abb. 25). Das konjugierte Ubiquitin zeigte auch in der späteren Phase der Infektion keine nennenswerten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen AcMNPV-Infektionen. Interessanterweise war aber die Umstrukturierung von IE2 in die langen fadenförmigen Strukturen bei den v-ubi AcMNPV-Mutanten weniger stark ausgeprägt. In diesen Fällen waren vielmehr ab 16 h p.i. stark verkürzte Formen der sonst langen und fädigen Kernstrukturen zu beobachten (Abb. 25).

Diese Ergebnisse zeigten, dass das viruskodierte Ubiquitin eine Rolle bei der Entstehung der fadenförmigen IE2-Strukturen in der späten baculoviralen Infektionsphase zu spielen scheint. Es war kein Einfluss auf die Verteilung von konjugiertem Ubiquitin und der IE2-Lokalisierung in der frühen Phase der Infektion auszumachen. Aufgrund der fehlenden Hinweise auf eine TBP-Stabilitätsänderung in den vorhergehenden Expressionsstudien unter Verwendung der v-ubi AcMNPV-Mutanten (Voß, 2003; Günther, 2005), wurden keine weiterführenden Lokalisierungsstudien mit Hilfe der v-ubi AcMNPV-Mutanten für TBP vorgenommen.

Abb. 25: Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in v-ubi AcMNPV-infizierten Insektenzellen (S. 91)

TN-368-Zellen wurden mit Wildtyp AcMNPV (wt) (A), v-ubi FS AcMNPV (B) oder v-ubi RGG AcMNPV (C) infiziert und 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von IE2 wurden die Zellen mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und zum Nachweis von Ubiquitin mit dem monoklonalen Antikörper FK2 (Maus) inkubiert. IE2 wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und konjugiertes Ubiquitin mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Signale einer Zelle in konfokalen Aufnahmen ist jeweils dargestellt (merge).

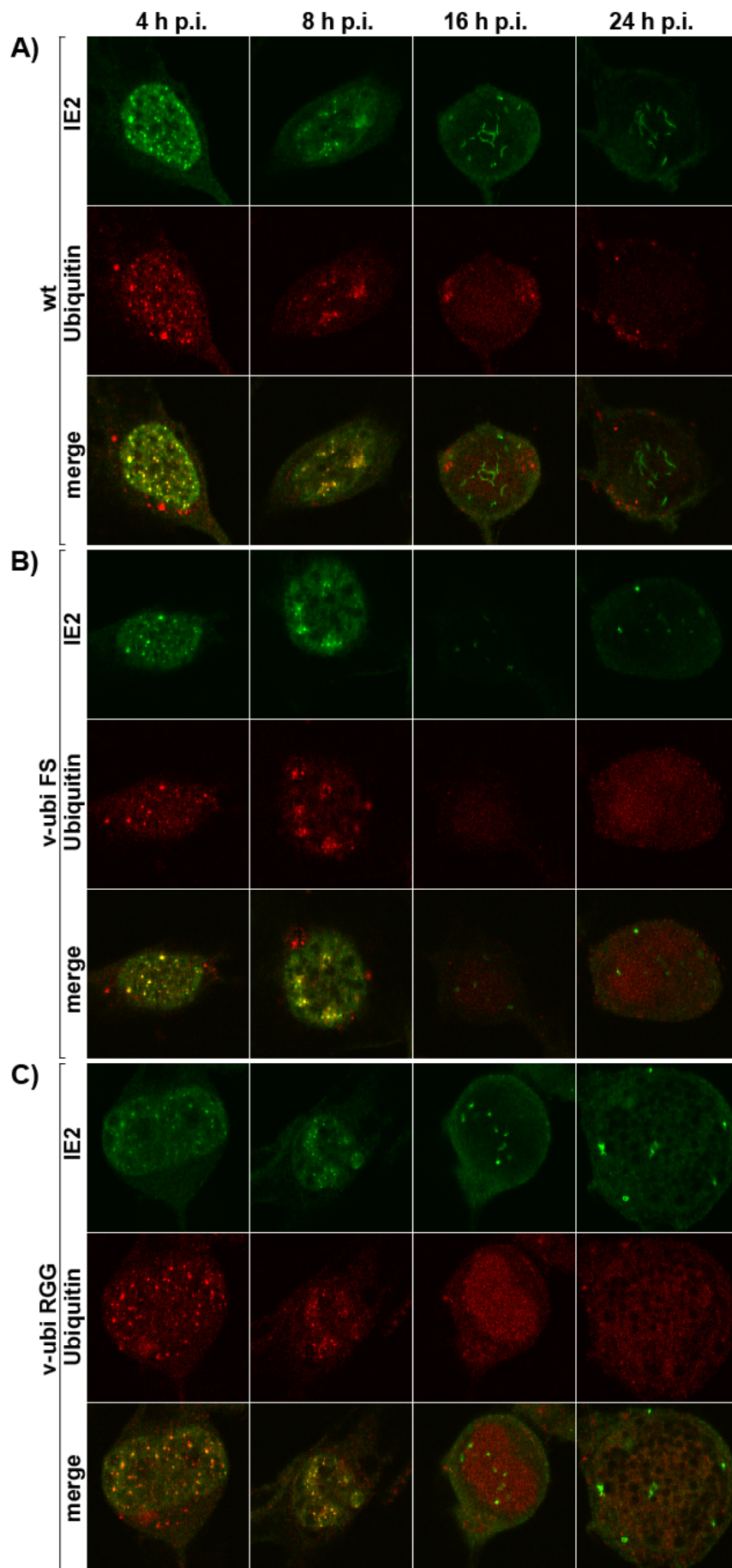


Abb. 25: Kolokalisierungsstudien von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in v-ubi AcMNPV-infizierten Insektenzellen

4. RNA-Interferenzstudien über TBP, IE2, DBP und LEF-4 während der Baculovirusinfektion

Um die Bedeutung des TBP-Anstiegs in der späten Phase der Baculovirusinfektion zu verstehen, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine experimentell erzielte Reduktion der TBP-Proteinmenge auf die AcMNPV-Infektion hat. Wenn TBP ein entscheidender Faktor für die Hyperexpression der sehr späten viralen Proteine P10 und Polyhedrin ist, müsste eine Inhibition von TBP in der späten Infektionsphase eine verringerte Entstehung viraler Einschlusskörper zur Folge haben. Da TBP als an der zellulären und der frühen Baculovirusinfektion beteiligter Transkriptionsfaktor angesehen wird, sollten Studien durchgeführt werden, in denen zu einem bestimmten, wählbaren Zeitpunkt die TBP-Proteinmenge reduziert werden kann. Dazu wurde die RNA-Interferenztechnik (RNAi) gewählt, die in Sf21-Zellen als effizient für die Funktionsuntersuchung baculoviraler Faktoren beschrieben wurde (Means et al., 2003; Valdes et al., 2003).

Die Untersuchungen der TBP-Stabilität in Sf21-Zellen in vorhergehenden Studien ergab, dass das TBP-Protein auch nach Hemmung der Translation für mindestens drei bis vier Tage stabil ist (Ergebnisteil 2.1.). Daher stellte sich die Frage, ob durch die Verwendung der RNAi-Methode, bei der es zu einer spezifischen Degradation von mRNA eines bestimmten Faktors kommt, ein Einfluss auf die Menge eines stabilen zellulären Proteins sichtbar werden würde. Andererseits wird TBP im Allgemeinen als ein essentieller Faktor der zellulären Transkription angesehen. Falls es gelingen sollte die TBP-Proteinmenge trotz der Stabilität des Proteins zu reduzieren, blieb zu klären, ob weitere Analysen in den dann unter Umständen absterbenden Zellen durchgeführt werden könnten. Somit war zu erwarten, dass sich die Reduktion des zellulären TBP-Proteins auf vielfältige Weise als komplexe Situation darstellen würde.

Als Vergleich sollten daher RNAi-Studien für virale Faktoren durchgeführt werden, von denen teilweise bekannt ist, wie essentiell sie für die virale Infektion sind (Kool et al., 1994; Okano et al., 1999). Zum einen sollte dadurch die RNAi-Methode in Insektenzellen etabliert werden, zum anderen war es das Ziel weitere Hinweise auf die Funktionen der untersuchten AcMNPV-Faktoren für den viralen Infektionsverlauf zu gewinnen.

Es wurden RNAi-Untersuchungen für virale Faktoren angefertigt, die an der Transkription bzw. an der Replikation der viralen DNA beteiligt sind. Zum einen wurde IE2 als mutmaßliche E3-Ligase, viraler Transaktivator und mit TBP kolokalisierendes Protein durch die RNA-Interferenztechnik analysiert. Zum anderen wurden Untersuchungen zum DNA-bindenden AcMNPV DBP-Protein angestellt, das wie TBP in viralen

DNA-Replikationszentren zu finden ist, dessen genaue Funktionen für die Virusinfektion aber bisher noch weitgehend unklar sind. Von besonderem Interesse war darüber hinaus die Untersuchung der Reduktion einer Komponente der viruskodierten RNA-Polymerase, welche die späte Baculovirustranskription steuert. Sollte der starke TBP-Anstieg in der späten Infektionsphase eine Rolle bei der Transkription später bzw. sehr später viraler Faktoren spielen, und sollte eine Reduktion von TBP in der späten Infektionsphase in den TBP-RNAi-Ansätzen gelingen, dann könnte die Expressionsinhibition einer viralen RNA-Polymerase-untereinheit interessante Vergleichsmöglichkeiten für den Einfluss auf die späte Virusinfektion bieten. Als Komponente der viralen RNA-Polymerase wurde LEF-4 gewählt, dessen essentielle Funktion für die Virusinfektion bisher angenommen wird, aber experimentell noch nicht nachgewiesen wurde.

4.1. Etablierung der RNA-Interferenztechnik

Ein deutlicher Anstieg von TBP war während der AcMNPV-Infektion sowohl in der Insektenzelllinie TN-368 als auch in Sf21-Zellen zu beobachten (Ergebnisteil 1). In Sf21-Zellen konnte die große TBP-Proteinmenge bis zur sehr späten Infektionsphase beobachtet werden. Darüber hinaus waren Sf21-Zellen mit einer viel höheren Effizienz durch die Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode transfizierbar als TN-368-Zellen (Abb. 8), weshalb alle RNA-Interferenzstudien in der Zelllinie Sf21 durchgeführt wurden.

4.1.1. Funktionsnachweis der RNAi-Methode in Sf21-Zellen

Zunächst wurde die Funktionalität der RNA-Interferenztechnik anhand von Kotransfektionen der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP und von dsRNA, welche die Degradation von eGFP auslösen sollte (dsRNA GFP), untersucht. Die dsRNA GFP bestand aus der Sequenz von 600 nt des eGFP-Gens. Nach Transfektion des Plasmids pIE1-hr5-eGFP alleine zeigten ca. 50 bis 60% der Sf21-Zellen grüne Signale im UV-Licht. Nach Kotransfektion der dsRNA GFP wurde die Expression von eGFP nahezu vollständig inhibiert (Abb. 26 A).

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Methode in AcMNPV-infizierten Zellen und zur Überprüfung der Spezifität der Expressionsinhibition eines Proteins nur durch eine bestimmte dsRNA, wurden Sf21-Zellen mit dem rekombinanten Baculovirus AcMNPV-CMVeGFP (Ac-CMVeGFP) infiziert. Bei dieser Virusmutante liegt die polyhedrin-Genregion deletiert vor und wurde durch die Insertion einer CMV-Promotor eGFP-Genkassette ersetzt

(persönliche Mitteilung von J. Vlak, Wageningen, Niederlande). Uninfizierte Zellen zeigten keine grüne Zellfärbung (Abb. 26 B c). Die meisten infizierten Zellen leuchteten 24 h p.i. grün (Abb. 26 B a). 1 h p.i. wurden die Zellen durch die Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode transfiziert. Infizierte Kontrollzellen, die nur mit den Puffern behandelt wurden, zeigten wie untransfizierte Zellen die eGFP-Expression der Virusmutante (Abb. 26 B b). Wurden die Zellen dagegen mit dsRNA GFP transfiziert, war 24 h p.i. die Expression von eGFP annähernd komplett inhibiert (Abb. 26 B d). Die Transfektion von dsRNA IE2 oder von unterschiedlichen Mengen von dsRNA TBP führte zu keiner Reduktion der eGFP-Expression (Abb. 26 B e-g).

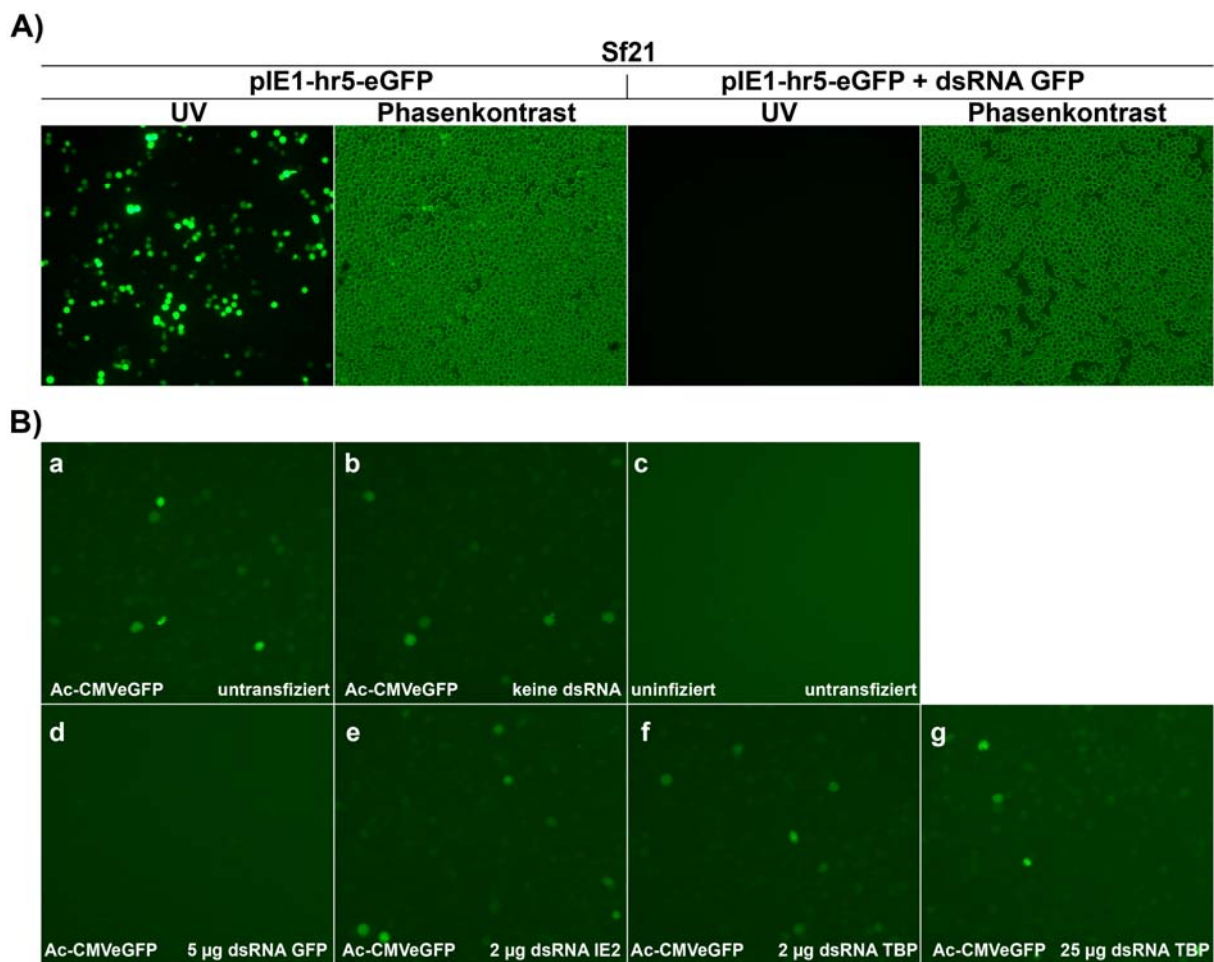


Abb. 26: Funktionsnachweis der RNAi-Methode in Sf21-Zellen und Spezifitätskontrollen von dsRNAs

A) 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 10 µg der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP transfiziert oder mit 10 µg pIE1-hr5-eGFP und 5 µg dsRNA GFP kotransfiziert. Phasenkontrast- und UV-Licht-Aufnahmen wurden 24 h p.t. aufgenommen. **B)** 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-CMVeGFP infiziert. Uninfizierte (**c**) und infizierte (**a,b,d-g**) Zellen wurden 1 h p.i. nur mit dem Transfektionspuffersystem ohne dsRNA behandelt (**b**) oder wurden mit 5 µg dsRNA GFP (**d**), 2 µg dsRNA IE2 (**e**), 2 µg dsRNA TBP (**f**) oder 25 µg dsRNA TBP (**g**) transfiziert. Für untransfizierte Zellen erfolgte weder eine Verwendung von dsRNA noch vom Transfektionspuffersystem (**a,c**). UV-Licht-Aufnahmen wurden 24 h p.t. angefertigt.

Dies bedeutet, dass die Expression eines viruskodierten Proteins durch die RNAi-Methode spezifisch inhibiert werden konnte. Damit wurde gezeigt, dass in Sf21-Zellen durch RNAi eine wirkungsvolle Technik zur Reduktion der Expression von ausgesuchten Faktoren zur Verfügung steht.

Ein Problem bei der Untersuchung von Faktoren durch die RNA-Interferenz ist, dass nicht alle Zellen mit der dsRNA transfiziert werden können. Dadurch wird der RNAi-Effekt durch die nicht-transfizierten Zellen überlagert. Anhand von Transfektionen mit der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP wurde ersichtlich, dass durch die verwendete Calcium-Präzipitat-Transfektionsmethode in Sf21-Zellen eine Transfektionseffizienz von mindestens 50 bis 60% erreicht wurde (Abb. 26 A). Dies bedeutet, dass bei Transfektion von dsRNA in einem Großteil der Zellen eine Inhibition der Expression des entsprechenden Faktors stattfinden sollte. Die Transfektionseffizienz der dsRNAs konnte nicht genau bestimmt werden. Eine Möglichkeit zum Nachweis der erfolgten Transfektion wäre die Kotransfektion der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP mit den dsRNAs. Auf diese Weise hätte theoretisch anhand der GFP-Expression die Transfektionseffizienz im jeweiligen Experiment abgeschätzt werden können. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die Kotransfektion von beliebiger dsRNA die Transfektion der Plasmid-DNA pIE1-hr5-eGFP entweder inhibiert wurde, oder die Expression von GFP unterdrückt wurde, so dass nur wenige grün leuchtende Zellen nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt). Der Funktionsnachweis der RNAi-Methode zeigte, dass die GFP-Expression der Virusmutante Ac-CMVVeGFP nur spezifisch durch die dsRNA eGFP inhibiert wurde (Abb. 26 B). Dies legte nahe, dass die Blockierung der GFP-Expression in Kotransfektionsexperimenten auf einer Inhibition der Transfektion der Plasmid-DNA durch die kotransfizierten dsRNAs beruhte.

4.1.2. Etablierung der optimalen Bedingungen für die RNAi-Methode

Um die optimalen Bedingungen für die RNAi-Methode und damit die effektivsten Inhibitionen der Proteinsynthese festzulegen, wurden verschiedene Zeitpunkte der dsRNA-Transfektion im Verhältnis zur Infektion der Zellen mit AcMNPV ausgetestet. Dies wurde mit Hilfe von dsRNA IE2 durchgeführt, die aus 567 nt der N-terminalen Region des AcMNPV IE2-Gens bestand. Zunächst wurde geprüft, ob die Expression des IE2-Proteins durch diese dsRNA inhibiert werden kann, und darüber hinaus wurde getestet, ob eine Infektion der Zellen der dsRNA-Transfektion vorausgehen sollte oder umgekehrt. Dazu wurden

Sf21-Zellen mit AcMNPV infiziert und 1 h p.i. mit dsRNA GFP oder mit zwei verschiedenen Mengen von dsRNA IE2 transfiziert oder blieben zur Kontrolle untransfiziert. Als Vergleich wurden die Sf21-Zellen zuerst transfiziert und 4 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Jeweils 5 h p.i. erfolgten die Proteinextraktpräparationen. Die anschließenden Expressionsanalysen ergaben eine Reduktion des IE2-Proteins in allen Transfektionsansätzen, wobei die dsRNA IE2-behandelten Zellen die schwächsten IE2-Signale und damit die stärkste Inhibition durch die RNAi zeigten (Abb. 27 A). Dass auch die dsRNA GFP-transfizierten Zellen eine geringere IE2-Proteinmenge im Vergleich zu den untransfizierten Zellen aufwiesen, ist dadurch zu erklären, dass die untransfizierten Zellen weniger gestresst waren als die mit der RNAi-Methode behandelten Zellen, und ihre Zelldichte dadurch zum Zeitpunkt der Proteinextrakterstellung höher war. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dsRNA GFP einen Einfluss auf die IE2-Expression hatte. Uninfizierte Kontrollzellen zeigten wie erwartet kein IE2-Signal. Es wurde deutlich, dass die effektivste Blockierung der IE2-Proteinsynthese erzielt werden konnte, wenn die Zellen nach der Transfektion infiziert wurden. Die Transfektion von 2 µg dsRNA IE2 war am wirkungsvollsten. Durch Redetektion der Membranen mit anti-SfTBP Antiserum wurden annähernd gleiche TBP-Proteinmengen nachgewiesen (Abb. 27 A). Dies verdeutlichte, dass es sich um eine spezifische IE2-Reduktion durch die dsRNA IE2 handelte.

Um der Frage nachzugehen, ob die Wirkung der transfizierten dsRNA IE2 zeitlich begrenzt ist, wurden Sf21-Zellen wie oben beschrieben transfiziert und vergleichend 4 und 24 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Es stellte sich heraus, dass die Blockierung der IE2-Proteinsynthese durch dsRNA IE2 in beiden Fällen gleich gut erfolgte (Abb 27 B). Dies lässt auf eine Stabilität und Funktionalität der dsRNA IE2 für mindestens 24 Stunden schließen.

Damit zeigte sich, dass die RNAi-Methode unter den getesteten Bedingungen geeignet ist die mRNA eines bestimmten viralen Faktors zu degradieren und dadurch seine Expression spezifisch zu inhibieren. Die Beobachtung, dass die auf die Transfektion folgende Infektion der Zellen die wirkungsvollere RNAi-Bedingung darstellt, bietet den Vorteil, dass in Zeitverlaufsexperimenten der Virusinfektion optional auch nach kurzer Infektionszeit Proteinextrakte hergestellt werden können. Somit wurden alle weiteren RNAi-Experimente so durchgeführt, dass die Transfektion der Sf21-Zellen ihrer Infektion vorausging.

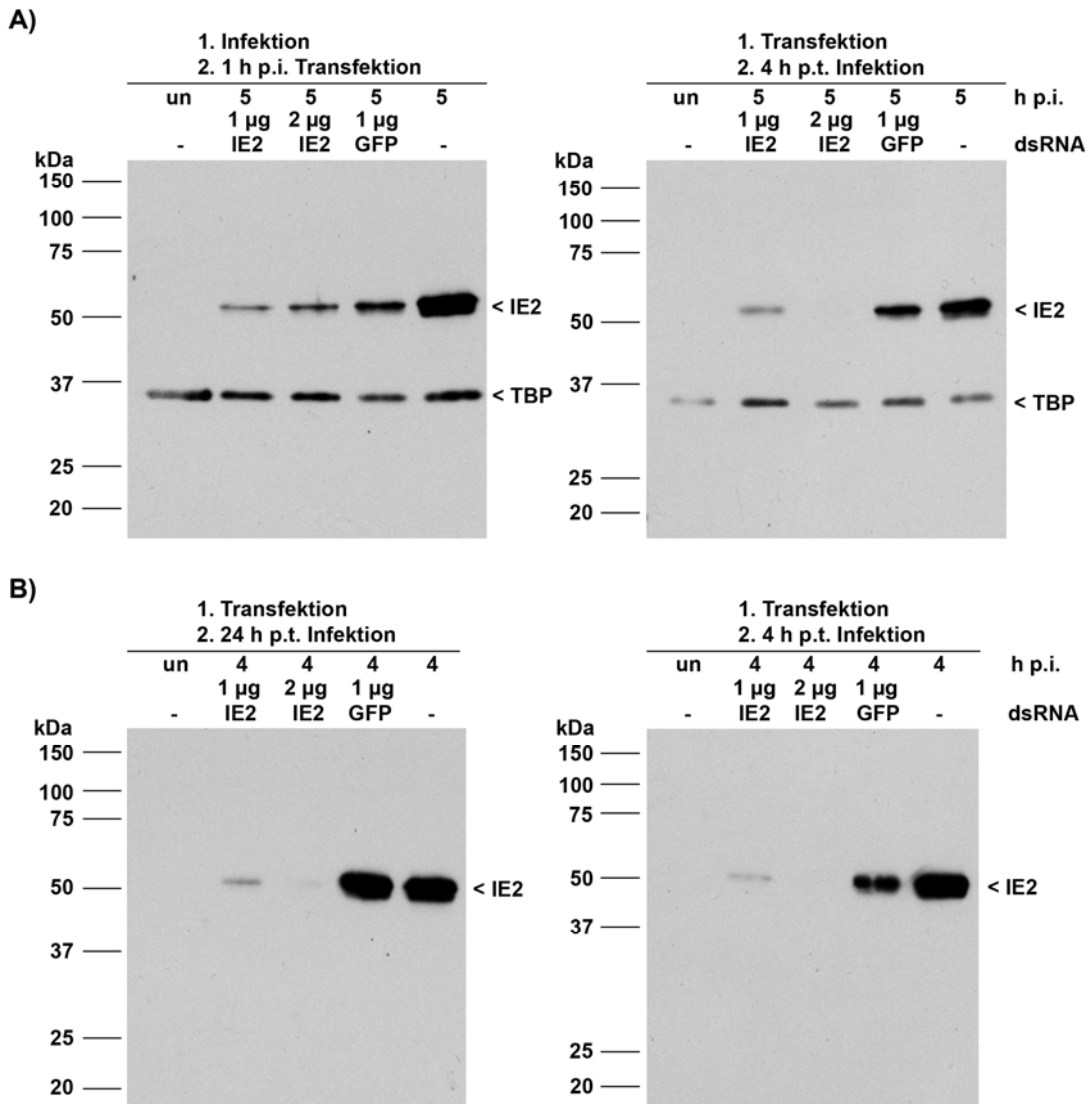


Abb. 27: Etablierung der RNAi-Methode mit dsRNA IE2 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

A) 1×10^6 uninfizierte (un) und AcMNPV-infizierte Sf21-Zellen wurden 1 h p.i. mit 1 µg dsRNA GFP, 1 µg dsRNA IE2 oder 2 µg dsRNA IE2 transfiziert oder blieben untransfiziert (-) (links). Zum Vergleich wurden untransfizierte (-) und mit 1 µg dsRNA GFP, 1 µg dsRNA IE2 oder 2 µg dsRNA IE2-transfizierte Sf21-Zellen 4 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert (un) (rechts). 5 h p.i. wurden jeweils nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von IE2 erfolgte durch Western Blot-Analysen mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und der von TBP durch Redetektion der Membranen mit polyklonalem anti-TBP (SA3889) Kaninchenserum. **B)** 1×10^6 untransfizierte (-) und mit 1 µg dsRNA GFP, 1 µg dsRNA IE2 oder 2 µg dsRNA IE2 transfizierte Sf21-Zellen wurden 24 h p.t. (links) oder 4 h p.t. (rechts) mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert (un). 4 h p.i. wurden jeweils nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von IE2 erfolgte mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

4.2. Funktionelle Untersuchungen zu IE2 durch RNAi während der Baculovirusinfektion

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von IE2 in der Baculovirusinfektion, wurden funktionelle Untersuchungen mittels RNAi im AcMNPV-Infektionsverlauf durchgeführt.

Nach Herstellung weiterer dsRNAs IE2 zeigte sich in Titrierungsversuchen, dass der Einsatz von ca. 20 µg dsRNA IE2 die höchste Effizienz für die Reduktion der IE2-Proteinsynthese erbrachte (Daten nicht gezeigt). Daher wurden RNAi-Analysen während des baculoviralen Infektionszyklus unter Verwendung von 20 µg dsRNA IE2 durchgeführt. Sf21-Zellen wurden mit dsRNA IE2 als Doppelansatz bzw. als Kontrolle mit 5 µg dsRNA GFP, die für die Blockierung der eGFP-Expression als ausreichend beschrieben worden sind (Ergebnisteil 4.1.1.), transfiziert oder blieben untransfiziert. 20 h p.t. erfolgte die AcMNPV-Infektion der Zellen, woraufhin 4, 8, 16 und 24 h p.i. Proteinextrakte hergestellt wurden.

Es war eine Reduktion des IE2-Proteins während der frühen Infektionsphase 4 und 8 h p.i. nach Transfektion von dsRNA IE2 zu erkennen (Abb. 28 A). Dabei traten zwischen den beiden Doppelansätzen z.T. Schwankungen in der Effizienz der Proteinreduktion auf, wie bei den Transfektionsansätzen der dsRNA IE2 a und b 8 h p.i. in Abb. 28 A zu sehen ist. Diese Schwankungen lassen sich darauf zurückführen, dass die Transfektionseffizienzen der dsRNAs in den verschiedenen Transfektionsansätzen variiert haben könnten, und dass durch die verwendete Transfektionsmethode die Zellen in den verschiedenen Gewebekulturplatten etwas unterschiedlichem Stress ausgesetzt wurden, wodurch die Zellzahl leicht variiert haben könnte. Bei der Analyse der Proteinmengen wurden gleiche Volumina der Proteinextrakte pro Spur der Proteingele aufgetragen, da aufgrund der Hyperexpression der sehr späten baculoviralen Proteine die Auftragung gleicher Proteinmengen das Ergebnis für andere Proteine in den Expressionsstudien verfälscht hätte (s. Methodenteil 8.3.). Dennoch war auch 8 h p.i. eine signifikante Reduktion der IE2-Proteinsynthese in beiden Ansätzen zu erkennen. Ab 16 h p.i. nahm die IE2-Proteinmenge generell deutlich ab.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die IE2-Proteinsynthese im Infektionszyklus durch die RNAi-Technik reduziert werden kann. Die RNAi-Studien wurden mehrmals unter ähnlichen Bedingungen wiederholt, wobei leichte Variationen der IE2-Proteinmengen zu verzeichnen waren, jedoch eine Abnahme der IE2-Proteinmenge nach Transfektion von dsRNA IE2 jeweils deutlich zu erkennen war.

Um die Auswirkungen von fehlendem IE2-Protein auf andere virale Faktoren und auf TBP zu untersuchen, wurden weitere Expressionsanalysen durchgeführt. Alle in Abb. 28 B-H

gezeigten Western Blot-Analysen stammten aus demselben RNAi-Experiment, welches für Abb. 28 A beschrieben wurde. Die nachgewiesenen Signale der Proteine entsprachen jeweils ihren berechneten Molekulargewichten.

Die Expression des am besten untersuchten baculoviralen Transaktivators IE1, der wie IE2 zu den sehr früh exprimierten Faktoren gehört, wurde durch die IE2-Proteinreduktion nicht nachweisbar beeinflusst (Abb. 28 B). Dass das IE1-Protein v.a. spät in der Infektion nachzuweisen ist, wurde auch in früheren Arbeiten beschrieben (Kremer und Knebel-Mörsdorf, 1998). Auch für das ebenfalls sehr früh gebildete PE38-Protein konnte auf Proteinebene keine Veränderung durch reduziertes IE2 gezeigt werden (Abb. 28 E). Früh exprimierte Virusfaktoren, wie das als essentiell für die Replikation geltende LEF-3-Protein oder das DBP-Protein, konnten ab 8 bzw. 16 h p.i. detektiert werden (Abb. 28 C). Dabei zeigten sich zwar leichte Schwankungen in ihrer Proteinmenge, aber generell war keine Zu- oder Abnahme der beiden Proteine in dsRNA IE2-transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen festzustellen, die mit dsRNA GFP behandelt worden waren. Die virale RNA-Polymerase-Komponente LEF-4 zählt ebenfalls zu den früh exprimierten Faktoren, wobei auch das LEF-4-Protein hauptsächlich spät in der Infektion zu detektieren ist. Auch die Menge an LEF-4-Protein blieb durch die frühe IE2-Reduktion unverändert (Abb. 28 F). Um einen möglichen Einfluss der IE2-Abnahme auf die TBP-Proteinmenge zu überprüfen, wurden die beiden Proteine zusammen auf derselben Membran nachgewiesen. Dabei wurde wiederum die IE2-Blockierung durch die dsRNA IE2 deutlich, jedoch blieb sowohl die Menge des TBP-Proteins in der frühen Infektionsphase als auch der TBP-Anstieg in den späten Infektionsphasen durch die dsRNA IE2 unverändert (Abb. 28 D). Als virale Strukturproteine wurden das auf der BV-Membran lokalisierte Glykoprotein GP64 und das Viruskapsidprotein P39 untersucht. GP64 besitzt einen früh sowie einen spät aktiven Promotor (Blissard und Rohrmann, 1989), während P39 ausschließlich spät im Infektionszyklus exprimiert wird (Pearson et al., 1988; Blissard et al., 1989). Auf beide Strukturproteine konnte keine Auswirkung der IE2-Reduktion beobachtet werden (Abb. 28 G, H).

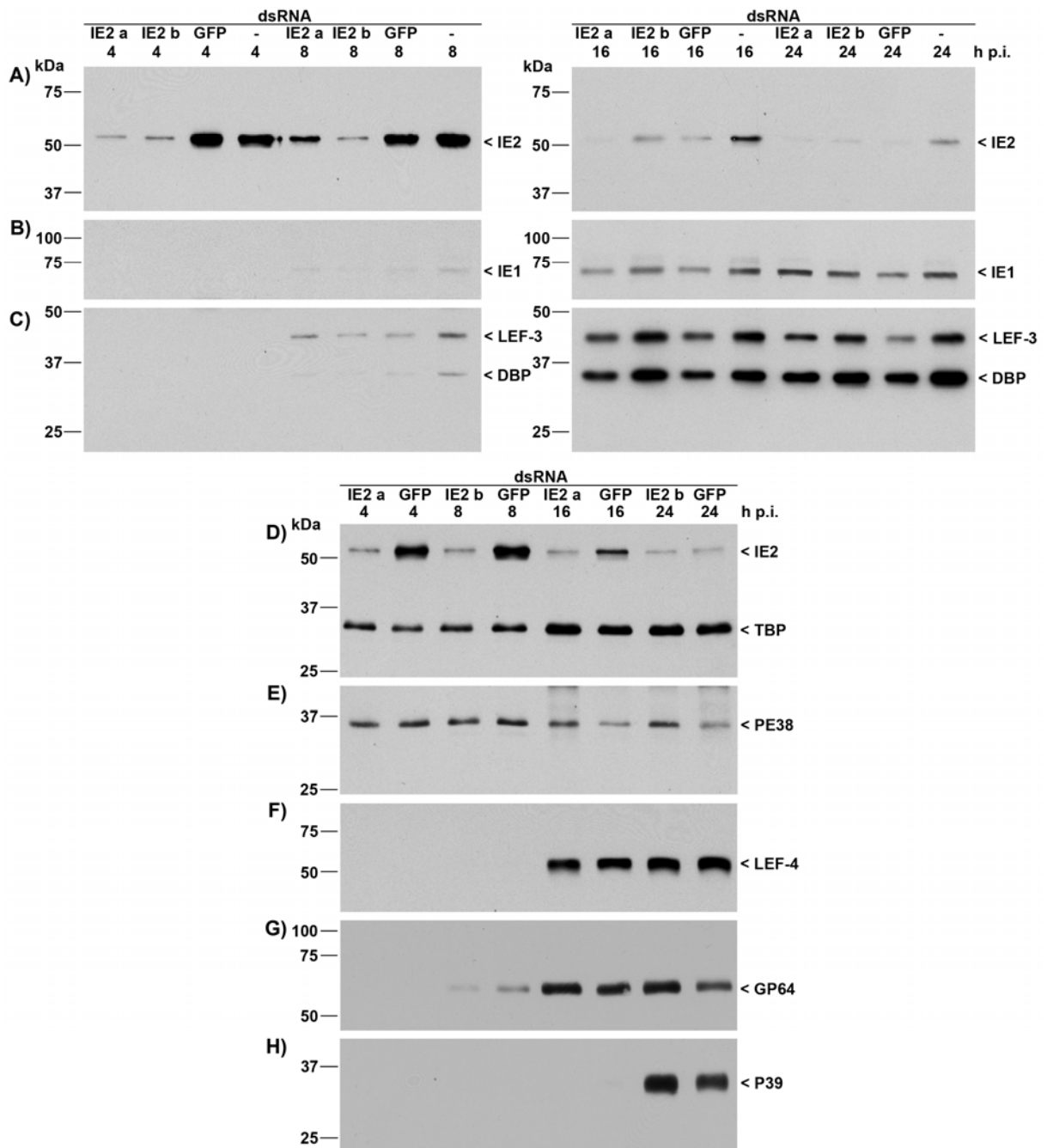


Abb. 28: Reduktion von IE2 durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf

1 x 10⁶ untransfizierte (-) und mit 20 µg dsRNA IE2 oder 5 µg dsRNA GFP transfizierte Sf21-Zellen wurden 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Die Transfektion mit dsRNA IE2 erfolgte jeweils als Doppelansatz (a und b). 4, 8, 16 und 24 h p.i. wurden Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden jeweils 5 µl Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. IE2 wurde mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum (**A**, **D**), IE1 mit polyklonalem anti-IE1 Kaninchenserum (**B**), LEF-3 mit polyklonalem anti-LEF-3 Kaninchenserum (**C**), DBP mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (**C**), TBP mit polyklonalem anti-TBP (SA3890) Kaninchenserum (**D**), PE38 mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum (**E**), LEF-4 mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum (**F**), GP64 mit monoklonalem GP64-Antikörper (AcV5 aus Maus) (**G**) und P39 mit monoklonalem P39-Antikörper (P10C6 aus Maus) (**H**) nachgewiesen. Die Inkubation der Membranen mit den gegen LEF-3 und DBP (**C**) bzw. gegen IE2 und TBP (**D**) gerichteten Antikörpern erfolgte jeweils gleichzeitig. Der Nachweis für IE2, IE1, LEF-3, DBP, TBP, PE38, LEF-4 und P39 wurde in nukleären Extraktfraktionen und der Nachweis von GP64 in zytoplasmatischen Extraktfraktionen durchgeführt. Die Pfeile markieren die spezifischen Proteinsignale. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

In den gezeigten Studien scheint die Menge des IE2-Proteins nicht essentiell für die Expression der untersuchten Proteine zu sein. Weder konnte durch dsRNA IE2 ein Einfluss auf den TBP-Anstieg noch auf sehr früh, früh oder spät exprimierte virale Proteine nachgewiesen werden. Auch die Virusproduktion wurde durch eine Reduktion der IE2-Proteinsynthese nicht beeinflusst, welches durch die P39-Expression (Abb. 28 H) und durch die gleiche Menge von Viruspolyeder-bildenden Zellen in dsRNA IE2- und in dsRNA GFP-transfizierten Zellen beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.3. Funktionsanalyse von AcMNPV DBP durch RNA-Interferenzstudien

Zur Vorbereitung von RNAi-Studien über das zelluläre TBP-Protein wurden vergleichende RNAi-Analysen des viralen Faktors AcMNPV DBP durchgeführt.

Das DNA-Binde-Protein DBP konnte in Lokalisierungsstudien in baculoviralen Replikationszentren nachgewiesen werden, weshalb vermutet wird, dass es regulatorische Funktionen bei der Replikation des viralen Genoms ausüben könnte (Okano et al., 1999; Mainz et al., 2002). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass AcMNPV DBP mit akkumulierenden IE2-Strukturen in DNA-Replikationszentren kolokalisiert (Mainz et al., 2002). Außer dass es bevorzugt an einzelsträngige DNA bindet und in *in vitro*-Analysen partielle DNA-Duplexe entwinden kann (Okano et al., 1999), ist über die genauen Funktionen von DBP bisher wenig bekannt.

4.3.1. Optimierung der Bedingungen für RNAi-Studien über AcMNPV DBP

Zur Herstellung von doppelsträngiger RNA für die Degradation der DBP-mRNA wurde einerseits eine 609 nt lange Region der N-terminalen Region und andererseits ein 593 nt langes Fragment des C-Terminus des DBP-Gens ausgewählt. Die synthetisierten dsRNAs DBP wurden in Titrierungsversuchen ausgetestet. Dazu wurden jeweils die Wirkungen von 0,5, 2, 5 oder 25 µg der N-terminalen bzw. der C-terminalen dsRNAs DBP mit der Transfektion von dsRNA GFP auf die DBP-Expression verglichen, nachdem die Zellen 7 h p.t. für 16 Stunden mit AcMNPV infiziert worden waren (Abb. 29 A). Dieser Infektionszeitpunkt wurde gewählt, da aus früheren Studien bekannt war, dass DBP 16 h p.i. in Expressionsstudien nachweisbar ist (Mainz et al., 2002). Da zunächst nicht bekannt war, wie stabil die dsRNA DBP in den transfizierten Zellen sein würde, wurden die Zellen in ersten Titrierungsexperimenten 7 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der DBP-Proteinsynthese war v.a. mit dsRNA DBP für

den N-Terminus nachzuweisen. Dabei waren 25 μg dsRNA DBP am effizientesten (Abb. 29 A).

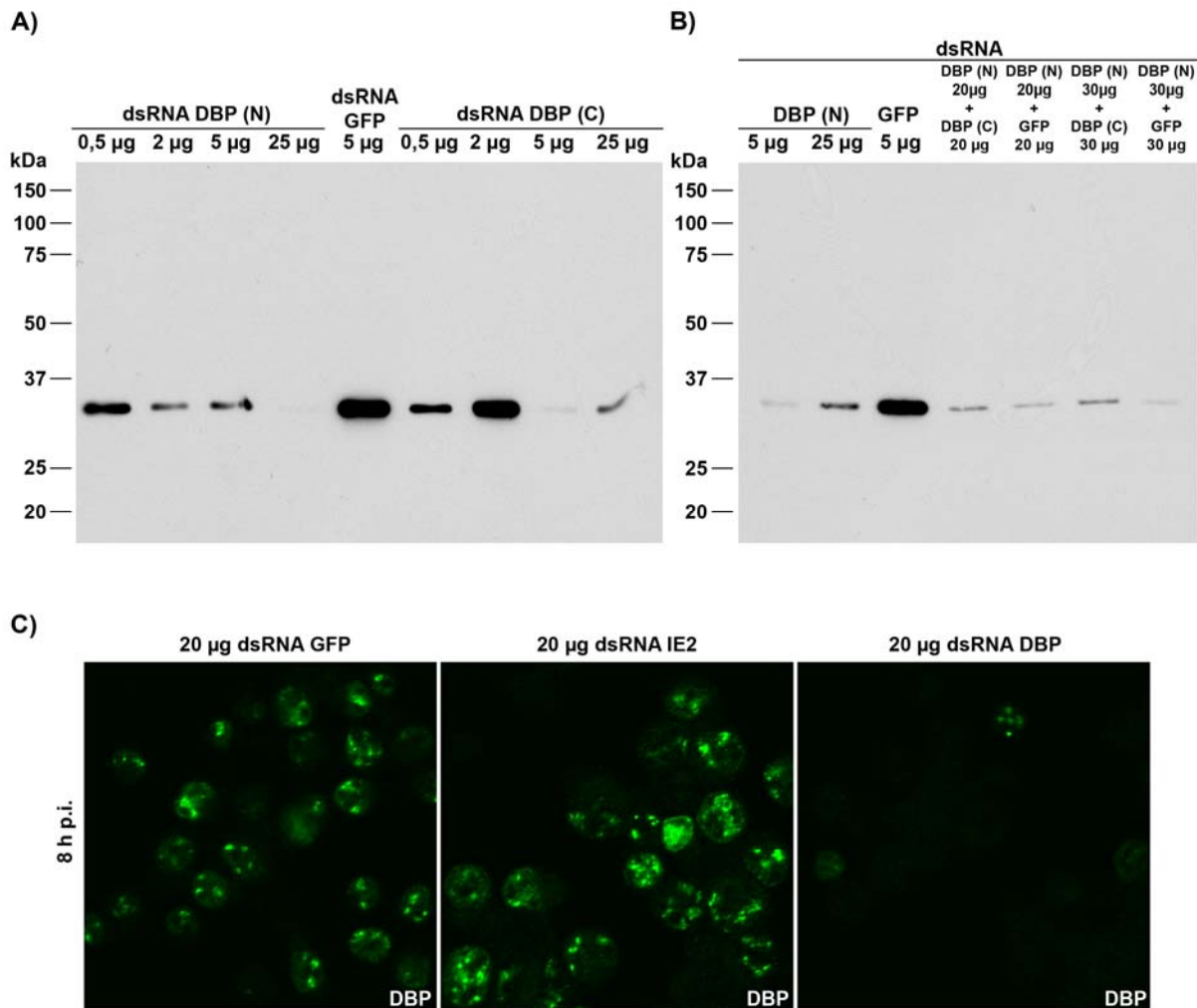


Abb. 29: Optimierung der RNAi-Methode für die Reduktion von DBP in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

A) 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit jeweils 0,5 μg , 2 μg , 5 μg oder 25 μg dsRNA DBP für den N-terminalen (N) oder C-terminalen (C) Bereich von DBP oder mit 5 μg dsRNA GFP transfiziert. Die Zellen wurden 7 h p.t. mit AcMNPV infiziert und es erfolgte 16 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. **B)** 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 5 μg oder 25 μg dsRNA DBP für den N-terminalen (N) Bereich von DBP, mit 5 μg dsRNA GFP oder mit verschiedenen Kombinationen von 20 μg bzw. 30 μg der N-terminalen (N) und C-terminalen (C) dsRNAs DBP und dsRNA GFP transfiziert. Die Zellen wurden 28 h p.t. mit AcMNPV infiziert und es erfolgte 16 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. Pro Spur wurden 5 μl Zelleextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von DBP wurde mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum durchgeführt. **C)** Sf21-Zellen wurden mit 20 μg dsRNA GFP, 20 μg dsRNA IE2 oder mit 20 μg dsRNA DBP transfiziert. 20 h p.t. erfolgte die Infektion der Zellen mit AcMNPV und 8 h p.i. die Fixierung der Zellen in 2% Paraformaldehyd. Die Färbung von DBP wurde mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum und Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) durchgeführt. Es sind konfokale Aufnahmen dargestellt.

Um festzustellen, ob die dsRNA DBP in den transfizierten Sf21-Zellen längere Zeit stabil war, wurden die Zellen nach der Transfektion über Nacht inkubiert und 28 h p.t. mit AcMNPV infiziert. In Kombinationstests der verschiedenen dsRNAs DBP und der dsRNA GFP mit 20 bzw. 30 µg der dsRNAs und nach Infektion der Zellen 28 h p.t. wurden 16 h p.i. ebenfalls effiziente DBP-Blockierungen festgestellt, die aber nicht deutlicher ausfielen als im ersten Test mit Infektionen 7 h p.t. (Abb. 29 B). In allen weiteren RNAi-Analysen wurden 20 µg der N-terminalen dsRNA DBP eingesetzt und die Zellen nach der Transfektion über Nacht für nachfolgende Infektionsstudien inkubiert.

Um die Auswirkung der reduzierten DBP-Menge auf die DBP-Lokalisierung in Kernstrukturen zu untersuchen, wurden Sf21-Zellen mit jeweils 20 µg der dsRNAs GFP, IE2 und DBP transfiziert und 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. 8 h p.i. konnten in indirekten Immunfluoreszenzstudien deutliche DBP-Kerndomänen in Zellen beobachtet werden, die mit dsRNA GFP und dsRNA IE2 transfiziert worden waren (Abb. 29 C). Eine klare Reduktion von DBP-Strukturen ausbildenden Zellen war dagegen durch Verwendung von dsRNA DBP nachweisbar. Damit scheint die Transfektion dieser dsRNA die Möglichkeit zu bieten, in künftigen Lokalisierungsstudien die Auswirkungen der DBP-Domänenbildung auf andere Faktoren genauer zu untersuchen. Dies ist im Verlauf dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt worden.

4.3.2. Funktionelle Studien über DBP durch RNAi während der AcMNPV-Infektion

Die große Effizienz der DBP-Proteinsyntheseinhibition durch die dsRNA DBP in den vorangegangenen Testexperimenten (Ergebnisteil 4.3.1.) ermöglichte Einblicke in die Funktion dieses viralen Faktors während der AcMNPV-Infektion gewinnen zu können. Es wurde untersucht, welche Auswirkung die reduzierte DBP-Expression auf virale und zelluläre Faktoren hat.

Dafür wurden Sf21-Zellen mit 20 µg dsRNA DBP im Doppelansatz oder als Kontrolle mit der funktionellen Menge von 5 µg dsRNA GFP transfiziert oder blieben untransfiziert. 20 h p.t. erfolgte die AcMNPV-Infektion der Zellen und es wurden 8, 16, 24 und 48 h p.i. Proteinextrakte hergestellt. Die Expression des DBP-Proteins wurde während des gesamten Infektionsverlaufs durch die Transfektion von dsRNA DBP signifikant reduziert (Abb. 30 A). Die stärkste Reduktion von DBP war 48 h p.i. zu beobachten, wobei in anderen Experimenten auch 16 und 24 h p.i. eine annähernd komplette DBP-Inhibition zu verzeichnen war (Daten

nicht gezeigt). Die im Folgenden aufgeführten Western Blot-Ergebnisse wurden alle mit denselben Extrakten, die in Abb. 30 A verwendet wurden, erhalten.

Zunächst wurde überprüft, ob die Reduktion von DBP einen Einfluss auf die Expression des in der frühen Infektionsphase mit DBP kolokalisierenden IE2-Proteins zeigte. IE2 wurde nach Ausschaltung von DBP weiterhin normal gebildet und in der späten Phase der Infektion nahm die IE2-Proteinmenge ab (Abb. 30 C).

Auf derselben Membran erfolgte auch der Nachweis des LEF-3-Proteins, welches ab 8 h p.i. nachgewiesen werden kann. Interessanterweise kam es zu einer sehr starken Zunahme der LEF-3-Proteinmenge nach Reduktion des DBP-Proteins (Abb. 30 C). Dies wurde bei einer kürzeren Expositionszeit noch deutlicher (Abb. 30 D). Diese extrem verstärkte Nachweisbarkeit von LEF-3 war ab der späten Infektionsphase 16 h p.i. bis in die sehr späte Phase bei 48 h p.i. möglich. Das LEF-3-Protein zählt zu den früh exprimierten und für die virale DNA-Replikation essentiellen Faktoren. Parallel zu LEF-3 wird auch die virale RNA-Polymeraseeinheit LEF-4 exprimiert. Die Inhibition von DBP führte zu einer, in diesem Beispiel nur schwer zu erkennenden, leicht erhöhten LEF-4-Proteinmenge 16 h p.i. (Abb. 30 B). 24 und 48 h p.i. wurde die Zunahme von LEF-4 durch die DBP-Reduktion deutlicher. Somit war von Interesse, ob weitere zu den LEFs gehörende Faktoren durch den Verlust von DBP in ihrer Expression beeinflusst sein könnten. Daher wurde das hauptsächlich als viraler Apoptoseinhibitor beschriebene P35-Protein untersucht. Wie zuvor für LEF-3 und LEF-4 gezeigt, konnte auch für P35 eine deutlich erhöhte Proteinmenge in der späten Phase der Infektion von 16 bis 48 h p.i. unter dem Einfluss einer verringerten DBP-Menge festgestellt werden (Abb. 30 E).

Um die Bedeutung dieser veränderten Proteinquantitäten für die Virusinfektion weiter zu erörtern, wurde die Expression von viralen Strukturproteinen analysiert. Das BV-Glykoprotein GP64 zeigte nach Transfektion von dsRNA DBP und dsRNA GFP keine Unterschiede im Expressionsverhalten (Abb. 30 F). Auch beim ausschließlich spät gebildeten, und in diesen Analysen erst 48 h p.i. detektierbaren, viralen Kapsidprotein P39 konnten keine deutlichen und reproduzierbaren Veränderungen der Expressionsmenge nachgewiesen werden (Abb. 30 G). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen während der späten Phase der Infektion zeigten ebenfalls keine Unterschiede bei der Entstehung von Viruspolyedern zwischen Zellen mit normaler und mit verringerter Menge des DBP-Proteins (Daten nicht gezeigt).

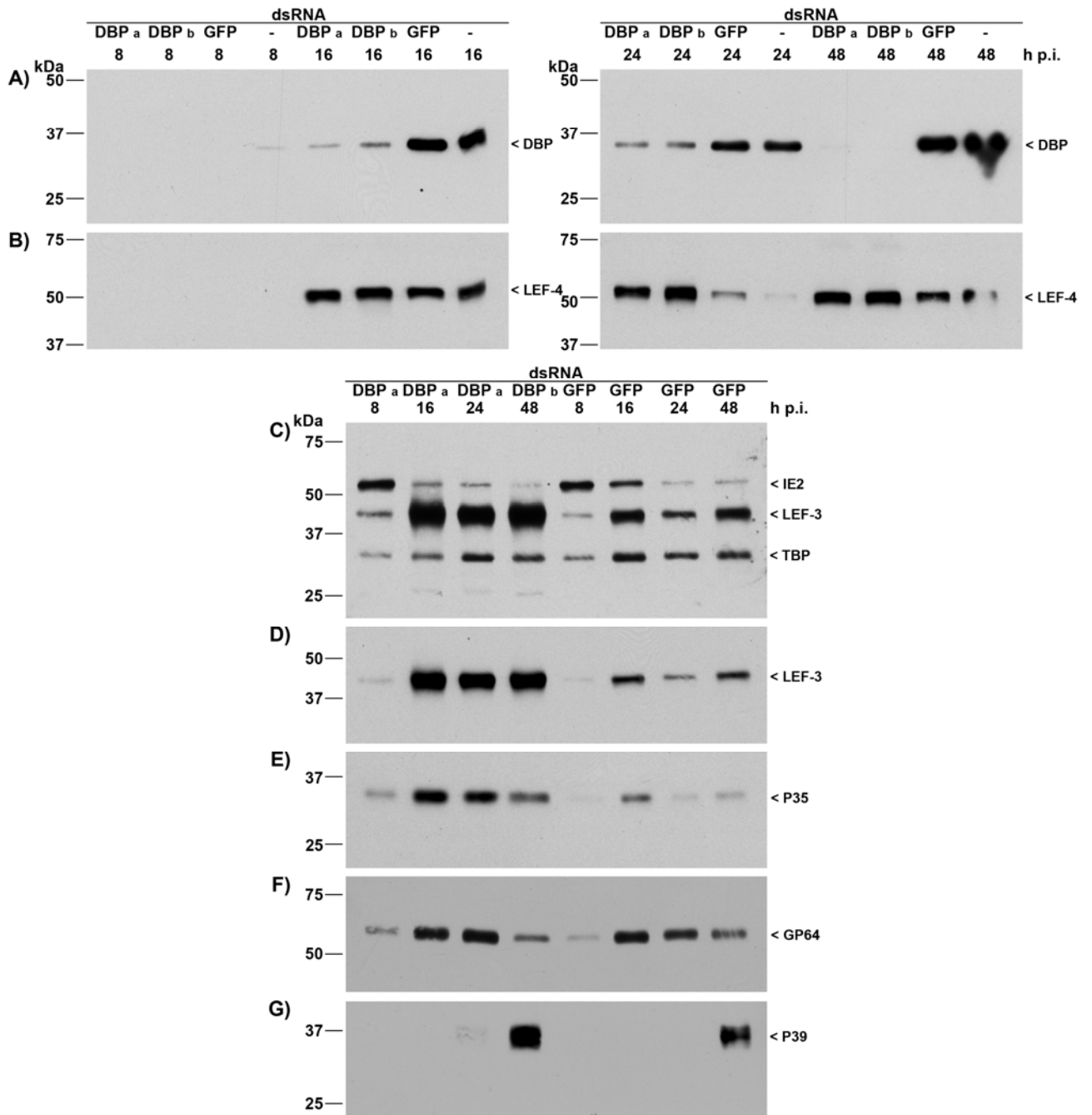


Abb. 30: Reduktion von DBP durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf

1 x 10⁶ untransfizierte (-) und mit 20 µg dsRNA DBP oder 5 µg dsRNA GFP transfizierte Sf21-Zellen wurden 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Die Transfektion mit dsRNA DBP erfolgte jeweils als Doppelansatz (a und b). 8, 16, 24 und 48 h p.i. wurden Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 µl Zelleextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. DBP wurde mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (A), LEF-4 mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum (B), IE2 mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum (C), LEF-3 mit polyklonalem anti-LEF-3 Kaninchenserum (C, D), TBP mit polyklonalem anti-TBP (SA3890) Kaninchenserum (C), P35 mit polyklonalem anti-P35 Kaninchenserum (E), GP64 mit monoklonalem GP64-Antikörper (AcV5 aus Maus) (F) und P39 mit monoklonalem P39-Antikörper (P10C6 aus Maus) (G) nachgewiesen. Die Membran C) wurde zunächst mit dem polyklonalen anti-LEF-3 Kaninchenserum inkubiert und anschließend mit den polyklonalen gegen IE2 und TBP gerichteten Kaninchenseren redetektiert. Der Nachweis für DBP, LEF-4, IE2, LEF-3, TBP und P39 wurde in nukleären Extraktfraktionen und der Nachweis von P35 und GP64 in zytoplasmatischen Extraktfraktionen durchgeführt. Die Pfeile markieren die spezifischen Proteinsignale. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

Es wurde analysiert, ob die Reduktion von DBP einen Einfluss auf die zelluläre TBP-Expression haben könnte. Beim Vergleich der Transfektionsansätze mit dsRNA DBP und mit dsRNA GFP zeigte sich jedoch, dass die TBP-Proteinmenge weder in der frühen, noch in der späten Infektionsphase durch einen DBP-Proteinverlust verändert wurde (Abb. 30 C). Der virusinduzierte Anstieg von TBP war ebenfalls nicht berührt, da die TBP-Menge nach 8 h p.i. weiterhin zunahm.

Zur Quantifizierung der LEF-Proteinzunahmen durch die DBP-Reduktion wurden die Bandenintensitäten der Western Blots in drei unabhängigen RNAi-Experimenten mit der Software „Image J“ bestimmt und die Mittelwerte für jedes Protein gebildet. In Tabelle 1 ist für jeden Infektionszeitwert jeweils das Verhältnis der Signalstärken von dsRNA DBP zu dsRNA GFP transfizierten Sf21-Zellen dargestellt. Zum Vergleich wurden auch Quantifizierungen der DBP- und TBP-Proteinmengen angestellt.

	DBP	LEF-3	LEF-4	P35	TBP
8 h p.i.	-	3,1	-	4,3	1,1
16 h p.i.	0,016	4,8	1,3	2,4	1
24 h p.i.	0,05	4,4	3	3,4	1,3
48 h p.i.	0,0001	2,6	2	2	0,9
Durchschnitt aller Zeitwerte	0,022	3,7	2,1	3	1,1

Tabelle 1: Quantifizierung der Expressionszunahme verschiedener Proteine durch Verwendung von dsRNA DBP in RNAi-Studien

1 x 10⁶ Sf21-Zellen wurden mit 20 µg dsRNA DBP oder 5 µg dsRNA GFP transfiziert und 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. 8, 16, 24 und 48 h p.i. wurden Detergenzextrakte hergestellt und die Proteine durch Western Blot-Analysen nachgewiesen. Die Quantifizierung der Proteinmengen von DBP, LEF-3, LEF-4, P35 und TBP erfolgte durch Auswertung von Western Blot-Signalen mit Hilfe der Software „Image J“. Es wurden für jedes untersuchte Protein aus jeweils drei unabhängigen RNAi-Experimenten die Mittelwerte der Signalintensitäten gebildet. Es sind für jedes Protein die Faktoren aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten nach Verwendung von dsRNA DBP und dsRNA GFP dargestellt.

Anhand der errechneten Faktoren ist die starke Reduktion von DBP nach Transfektion der dsRNA DBP ersichtlich, wobei die genaue Bestimmung der DBP-Bandenintensitäten aufgrund der geringen sichtbaren DBP-Mengen schwierig war. 8 h p.i. war kein DBP-Protein messbar. Die Menge des LEF-3-Proteins war durch die Transfektion von dsRNA DBP 8 h p.i. um den Faktor 3, 16 h p.i. und 24 h p.i. um mehr als das 4-fache und 48 h p.i. um ca. den Faktor 2,6 erhöht (Tabelle 1). Der durchschnittliche Anstieg von LEF-3, gemittelt aus allen Zeitwerten, lag nach der Inhibition von DBP beim 3,7-fachen. LEF-4 war 8 h p.i. nicht messbar, zeigte aber ab 16 h p.i. eine schwache Erhöhung nach Reduktion von DBP, die ab 24 h p.i. deutlicher ausfiel, und im Durchschnitt aller Zeitwerte ca. einer Verdopplung der

LEF-4-Proteinmenge entsprach. Für P35 konnte wiederum eine stärkere Wirkung der DBP-Abnahme ausgemacht werden, die durchschnittlich eine 3-fach höhere P35-Menge zur Folge hatte. Auffällig erscheint, dass 48 h p.i. die Erhöhung der LEF-Proteine durch die DBP-Reduktion leicht zurückging. Die Proteinmengen von TBP wurden als Beispiel für ein Protein, dessen Bandenmuster unbeeinflusst von der DBP-Abnahme erschien, im Vergleich gemessen. Man erkennt, dass es in diesem Fall zu keiner signifikanten Veränderung der TBP-Proteinmenge durch die Blockierung der DBP-Synthese kam. Dies bedeutet, dass die TBP-Proteinmenge auch nach einer Reduktion von DBP in der späten Infektionsphase weiterhin anstieg.

Somit führten die RNA-Interferenzanalysen bei Verwendung von dsRNA DBP zu einer Inhibition der DBP-Proteinsynthese im AcMNPV-Infektionsverlauf. Auf die Expression von TBP oder des sehr früh exprimierten viralen Faktors IE2 hatte diese Reduktion keinen messbaren Einfluss. Dagegen konnte durch eine Blockierung der DBP-Synthese interessanterweise eine signifikante Erhöhung der Proteinmengen der hier untersuchten „late expression factors“ LEF-3, LEF-4 und P35 nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um eine Stabilisierung oder um eine verstärkte Synthese der Proteine handelte, wurde nicht untersucht. Die Erhöhung der LEFs durch die Reduktion von DBP hatte weder einen aktivierenden noch einen inhibitorischen Einfluss auf die Synthese von viralen Strukturproteinen oder auf die Produktion von viralen Einschlusskörpern in der sehr späten baculoviralen Infektionsphase.

4.4. Analysen der LEF-4-Funktionen durch RNA-Interferenzstudien im AcMNPV-Infektionsverlauf

Beim AcMNPV LEF-4-Protein handelt es sich um eine der vier Untereinheiten der viruskodierten, α -Amanitin-resistenten RNA-Polymerase. Diese ist für die Expression der späten und hyperexprimierten sehr späten viralen Faktoren verantwortlich. Aufgrund früherer Studien wird angenommen, dass LEF-4 eine essentielle Rolle für die späte Genexpression spielt (Partington et al., 1990; Carstens et al., 1994). Somit wird erwartet, dass die Inhibition der LEF-4-Expression zur Blockade der späten und sehr späten viralen Transkription führen sollte.

4.4.1. Expressionsstudien und RNAi-Etablierung für LEF-4 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

Zunächst wurde die LEF-4-Expression mit der TBP-Expression in infizierten Sf21-Zellen verglichen. LEF-4 war nachweisbar von 16 h p.i. bis in die sehr späte Infektionsphase bei 72 h p.i. (Abb. 31 A oben). Der Nachweis von LEF-4 begann damit in Sf21-Zellen etwas später als in TN-368-Zellen (Abb. 17), was durch den allgemein etwas langsameren Infektionsverlauf von AcMNPV in Sf21-Zellen begründet ist. Der Zeitpunkt der LEF-4-Nachweisbarkeit entsprach genau dem Beginn der TBP-Proteinzunahme in Sf21-Zellen (Abb. 31 A unten).

Für LEF-4-Inhibitionsstudien wurden doppelsträngige RNAs synthetisiert, die 543 nt der N-terminalen oder 614 nt der C-terminalen Sequenz von LEF-4 entsprachen. Es wurden Titrierungsanalysen mit zwei verschiedenen Konzentrationen von N-terminalen dsRNAs LEF-4, die aus zwei unterschiedlichen Präparationen stammten (a und b), und mit Kombinationen aus N-terminaler und C-terminaler dsRNA LEF-4 durchgeführt. Im Vergleich dazu wurden mit dsRNA GFP transfizierte sowie untransfizierte Zellen verwendet. 28 h p.t. wurden die Zellen infiziert, und 16 h p.i. wurden Proteinextrakte hergestellt. Es war eine Reduktion von LEF-4 nachweisbar, die nach Transfektion von 5 μ g der dsRNAs LEF-4 am effizientesten war (Abb. 31 B). Wurde eine größere Menge von 25 μ g der dsRNAs LEF-4 verwendet, nahm die Wirksamkeit der LEF-4-Inhibition ab. Somit wurden für alle folgenden LEF-4 RNAi-Analysen 5 μ g der N-terminalen dsRNAs LEF-4 eingesetzt.

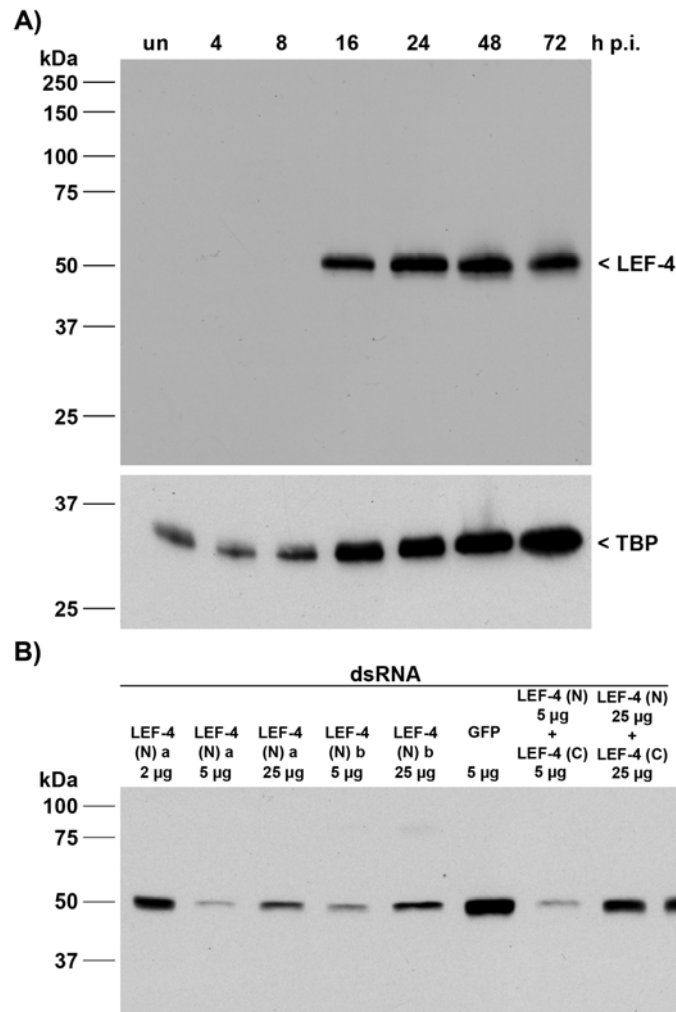


Abb. 31: Expression von LEF-4 in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen und Titrierung von dsRNA LEF-4 für die RNAi-Methode

A) Aus 2×10^6 uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von LEF-4 wurde mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum (oben) durchgeführt. Zum Vergleich ist der Nachweis von TBP mit polyklonalem anti-SfTBP (SA3890) Kaninchenserum aus denselben Zellextrakten dargestellt (unten). **B)** 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 2, 5 oder 25 µg dsRNA LEF-4 für den N-terminalen (N) Bereich von LEF-4, die aus zwei verschiedenen dsRNA Präparationen (a und b) stammten, oder mit 5 µg dsRNA GFP transfiziert oder blieben untransfiziert (-). Zusätzlich wurden Kombinationen von jeweils 5 µg bzw. 25 µg N-terminaler (N) und C-terminaler (C) dsRNA LEF-4 transfiziert. Die Zellen wurden 28 h p.t. mit AcMNPV infiziert und es erfolgte 16 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von LEF-4 wurde mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum durchgeführt. Die Proteinstandards sind links angegeben.

4.4.2. Funktionelle LEF-4-Untersuchungen durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf

Für funktionelle Untersuchungen von LEF-4 wurden jeweils 5 µg der dsRNAs LEF-4 im Doppelansatz und als Vergleich 5 µg dsRNA GFP in Sf21-Zellen transfiziert bzw. die Zellen blieben untransfiziert. Die Infektion mit AcMNPV folgte 20 h p.t., woraufhin 8, 16, 24 und 48 h p.i. Proteinextrakte für Western Blot-Analysen präpariert wurden. Es war eine Reduktion von LEF-4 nach dsRNA LEF-4-Transfektion festzustellen, die einer nahezu kompletten Blockierung der LEF-4-Proteinsynthese entsprach. Dies war für beide Transfektionsansätze der dsRNA LEF-4 zu allen Infektionszeitpunkten ab 16 h p.i. zu beobachten (Abb. 32 A). Diese deutliche Inhibition von LEF-4 bot eine sehr gute Voraussetzung, um in denselben Extrakten die Bedeutung von LEF-4 für die Expression von TBP bzw. von viralen Faktoren zu analysieren.

Die Expression von TBP wurde durch die Transfektion von dsRNA LEF-4 im Vergleich zur Transfektion von dsRNA GFP nicht beeinflusst (Abb. 32 B). Der Anstieg der TBP-Proteinmenge blieb somit durch die Reduktion von LEF-4 unverändert bestehen. Dies wurde durch mehrfache Wiederholung der Experimente bestätigt. Die Doppelansätze mit dsRNA LEF-4 zeigten leichte Variationen für die TBP-Proteinmenge, die auf die zuvor beschriebenen Schwankungen der Zellzahl durch die verwendete Transfektionsmethode zurückzuführen waren (Ergebnisteil 4.2.).

Als Beispiel eines sehr früh exprimierten viralen Faktors wurde die Expression von IE2 untersucht, für dessen Proteinmenge keine Veränderung nach der LEF-4-Inhibition gezeigt werden konnte (Abb. 32 C).

Die Reduktion von LEF-4 zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Expression der früh gebildeten viralen Proteine DBP, LEF-3 und P35 während des Infektionsverlaufes (Abb. 32 C, D).

Da LEF-4 eine Komponente der viruskodierten RNA-Polymerase ist, konnte erwartet werden, dass die Inhibition der LEF-4-Expression einen Einfluss auf die Expression später und sehr später viraler Faktoren haben würde. Das eine frühe und späte Promotorfunktion besitzende BV-Glykoprotein GP64 wurde jedoch durch die Reduktion von LEF-4 in seiner Expression nicht beeinflusst (Abb. 32 E).

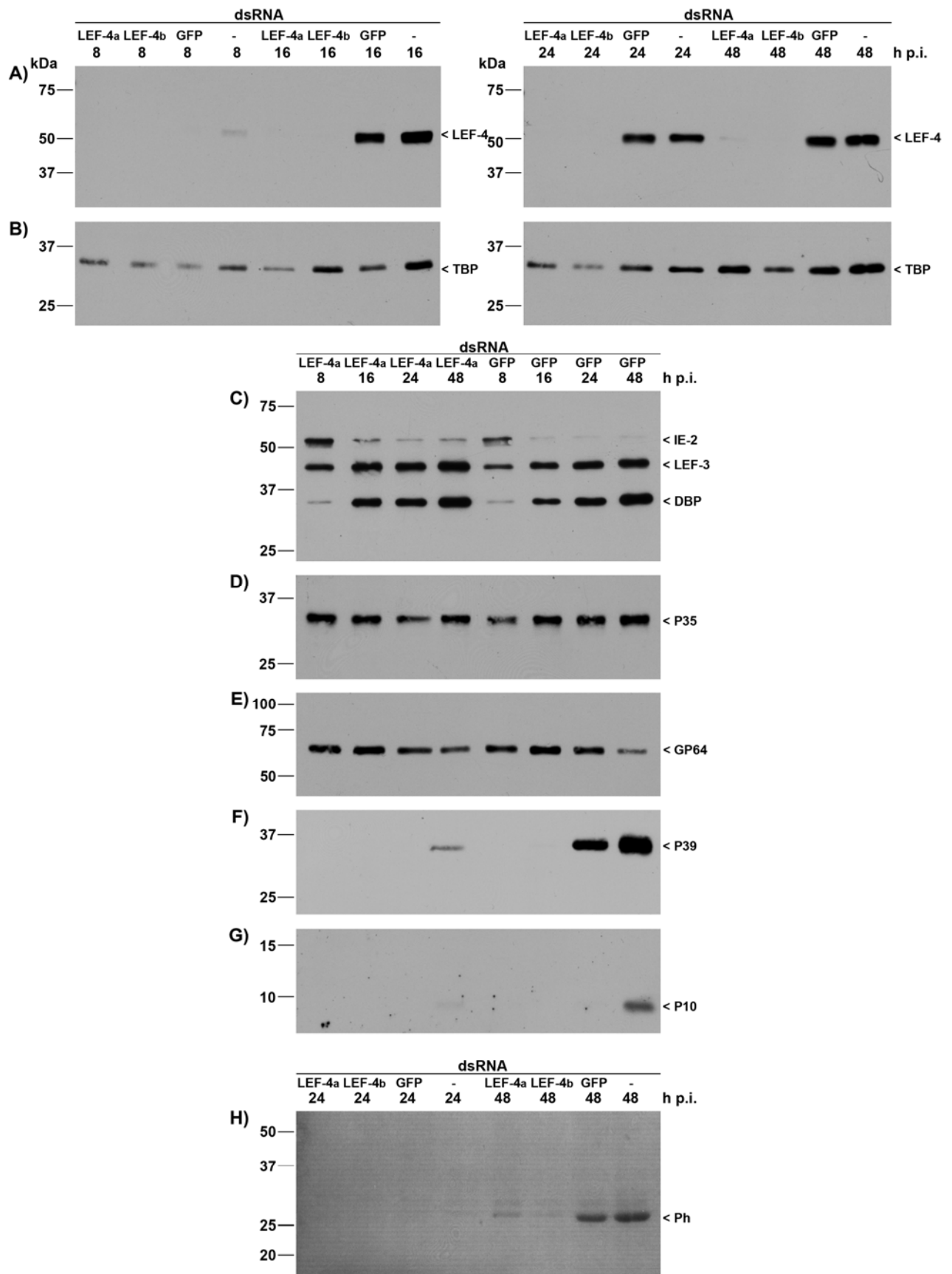


Abb. 32: Inhibition von LEF-4 durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf

Abb. 32: Inhibition von LEF-4 durch RNAi im baculoviralen Infektionsverlauf (S. 111)

1 x 10⁶ untransfizierte (-) und mit 5 µg dsRNA LEF-4 oder 5 µg dsRNA GFP transfizierte Sf21-Zellen wurden 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Die Transfektion mit dsRNA LEF-4 erfolgte jeweils als Doppelansatz (a und b). 8, 16, 24 und 48 h p.i. wurden Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden jeweils 5 µl Zellextrakt aufgetragen, auf 10%igen (**A-F, H**) bzw. 15%igen (**G**) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen (**A-F, H**) oder PVDF-Membranen (**G**) transferiert. LEF-4 wurde mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum (**A**), TBP mit polyklonalem anti-TBP (SA3890) Kaninchenserum (**B**), IE2 mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum (**C**), LEF-3 mit polyklonalem anti-LEF-3 Kaninchenserum (**C**), DBP mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (**C**), P35 mit polyklonalem anti-P35 Kaninchenserum (**D**), GP64 mit monoklonalem GP64-Antikörper (AcV5 aus Maus) (**E**), P39 mit monoklonalem P39-Antikörper (P10C6 aus Maus) (**F**) und P10 mit polyklonalem anti-P10 Kaninchenserum (**G**) nachgewiesen. Die Membran **C** wurde gleichzeitig mit den polyklonalen gegen IE2, LEF-3 und DBP gerichteten Kaninchenseren detektiert. Der Nachweis für LEF-4, TBP, IE2, LEF-3, DBP, P39 und P10 wurde in nukleären Extraktfraktionen und der Nachweis von P35 und GP64 in zytoplasmatischen Extraktfraktionen durchgeführt. Bei Membran **H** handelt es sich um die Aufnahme einer mit Ponceau S-Lösung angefärbten Nitrozellulosemembran nach Auftragung nukleärer Detergenzextrakte zum Nachweis von Polyhedrin (Ph). Die Pfeile markieren die spezifischen Protein-signale. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

Somit konzentrierten sich die folgenden Studien auf die späte und sehr späte virale Genexpression. Es zeigte sich, dass das erst spät exprimierte AcMNPV-Kapsidprotein P39 nach der LEF-4-Inhibition in seiner Expression reduziert wurde. In dsRNA GFP-transfizierten und damit LEF-4-enthaltenen Zellen konnte P39 ab 24 h p.i. und bis 48 h p.i. stark ansteigend nachgewiesen werden. Nach der Reduktion von LEF-4 zeigten Zellen dagegen nur ein sehr schwaches P39-Signal 48 h p.i. (Abb. 32 F). Zur Untersuchung der sehr späten Genexpression wurde die Proteinsynthese von AcMNPV P10 untersucht. Es war nur eine klare Bande in dsRNA GFP-transfizierten Zellen 48 h p.i. detektierbar, wohingegen nach Blockierung der LEF-4-Synthese keine Expression von P10 mehr erkennbar war (Abb. 32 G). Die Darstellung des Nachweises des hyperexprimierten Polyhedrin (Ph)-Proteins war in Western Blot-Studien aufgrund der starken Überexpression kaum möglich. Daher ist in diesem Fall eine mit Ponceau S-Lösung gefärbte Nitrozellulosemembran dargestellt. Man erkennt, dass in der sehr späten Infektionsphase bei 48 h p.i. in dsRNA GFP-transfizierten und untransfizierten Sf21-Zellen Polyhedrinbanden mit einem Molekulargewicht von 29 kDa auftraten. Diese starken Signale waren nach Behandlung der Zellen mit dsRNA LEF-4 kaum nachweisbar (Abb. 32 H).

Aus diesen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass nach Transfektion von dsRNA LEF-4 eine nahezu vollständige Inhibition der Synthese des LEF-4-Proteins erreicht wurde, die auf die frühe virale Genexpression, ebenso wie auf die TBP-Expression, keinen Einfluss hatte. Die Produktion des spät exprimierten viralen Strukturproteins P39 wurde, wie die Synthese der sehr spät exprimierten Proteine P10 und Polyhedrin, dagegen massiv inhibiert. Damit konnte gezeigt werden, dass durch RNAi-Experimente die Essentialität von LEF-4 für die späte virale Genexpression darstellbar ist.

4.4.3. Einfluss der LEF-4-Inhibition auf die Baculovirusproduktion

Die Bedeutung der LEF-4-Expression für die späte virale Genexpression und die damit einhergehende Virusproduktion wurde durch lichtmikroskopische Studien untersucht. Die Analysen erfolgten durch Phasenkontrastaufnahmen von RNAi-Ansätzen in Sf21-Zellen, wie sie im Ergebnisteil 4.4.2. beschrieben wurden.

24 h p.i. zeigten ca. 5% der untransfizierten und mit dsRNA GFP transfizierten Zellen erste Viruspolyeder (Abb. 33 A). In Versuchsansätzen, bei denen die Zellen mit dsRNA LEF-4 behandelt wurden, war die Zahl Polyeder-bildender Zellen dagegen reduziert. Die Wirkung der LEF-4-Inhibition wurde verstärkt 48 h p.i. sichtbar, da zu diesem sehr späten Infektionszeitpunkt die Anzahl der Sf21-Zellen mit Polyedern im normalen AcMNPV-Infektionsverlauf stark erhöht ist. Dabei war lichtmikroskopisch eine sichtbare Reduktion der Polyederbildung unter dem Einfluss von dsRNA LEF-4 zu beobachten (Abb. 33 A). Zur Quantifizierung der Polyederreduktion durch dsRNA LEF-4 wurden für jeden Transfektionsansatz 48 h p.i. mehrere Gesichtsfelder dieses exemplarischen Experimentes ausgezählt und der Mittelwert der Einschlusskörper zeigenden Zellen in Prozent berechnet. Untransfizierte und mit dsRNA GFP transfizierte Zellen enthielten zu 53% bzw. 54% Polyeder, wohingegen nur in 11 bis 13% der dsRNA LEF-4-behandelten Zellen Polyeder auszumachen waren (Abb. 33 B). Dass die virale Einschlusskörperbildung nicht in allen dsRNA LEF-4-behandelten Zellen inhibiert wurde, ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle Zellen der Gewebekulturschale mit den dsRNAs transfiziert werden konnten.

Abb. 33: Auswirkungen der LEF-4-Reduktion auf die Baculovirus-Polyederbildung und die Virusproduktion (S. 114)

1 x 10⁶ untransfizierte und mit 5 µg dsRNA LEF-4 oder 5 µg dsRNA GFP transfizierte Sf21-Zellen wurden 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. Die Transfektion mit dsRNA LEF-4 erfolgte jeweils als Doppelansatz (a und b). Es sind Phasenkontrast-Aufnahmen 24 und 48 h p.i. dargestellt (A). Die Anzahl der Viruspolyeder enthaltenden Zellen wurde 48 h p.i. bestimmt und als Durchschnitt von jeweils fünf Gesichtsfeldern eines beispielhaften Experimentes in Prozent angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Zählungen ist als Fehlerbalken angegeben (B). 1 x 10⁶ Sf21-Zellen wurden mit 5 µg dsRNA LEF-4 oder 5 µg dsRNA GFP transfiziert und 20 h p.t. mit AcMNPV infiziert. 24, 48 und 72 h p.i. wurden Zellkulturüberstände abgenommen und ihre Infektiosität mit „Plaque-Test“-Analysen bestimmt. Die Infektiosität der Überstände eines exemplarischen RNAi-Experimentes ist in pfu/ml angegeben (Y-Achse) (C).

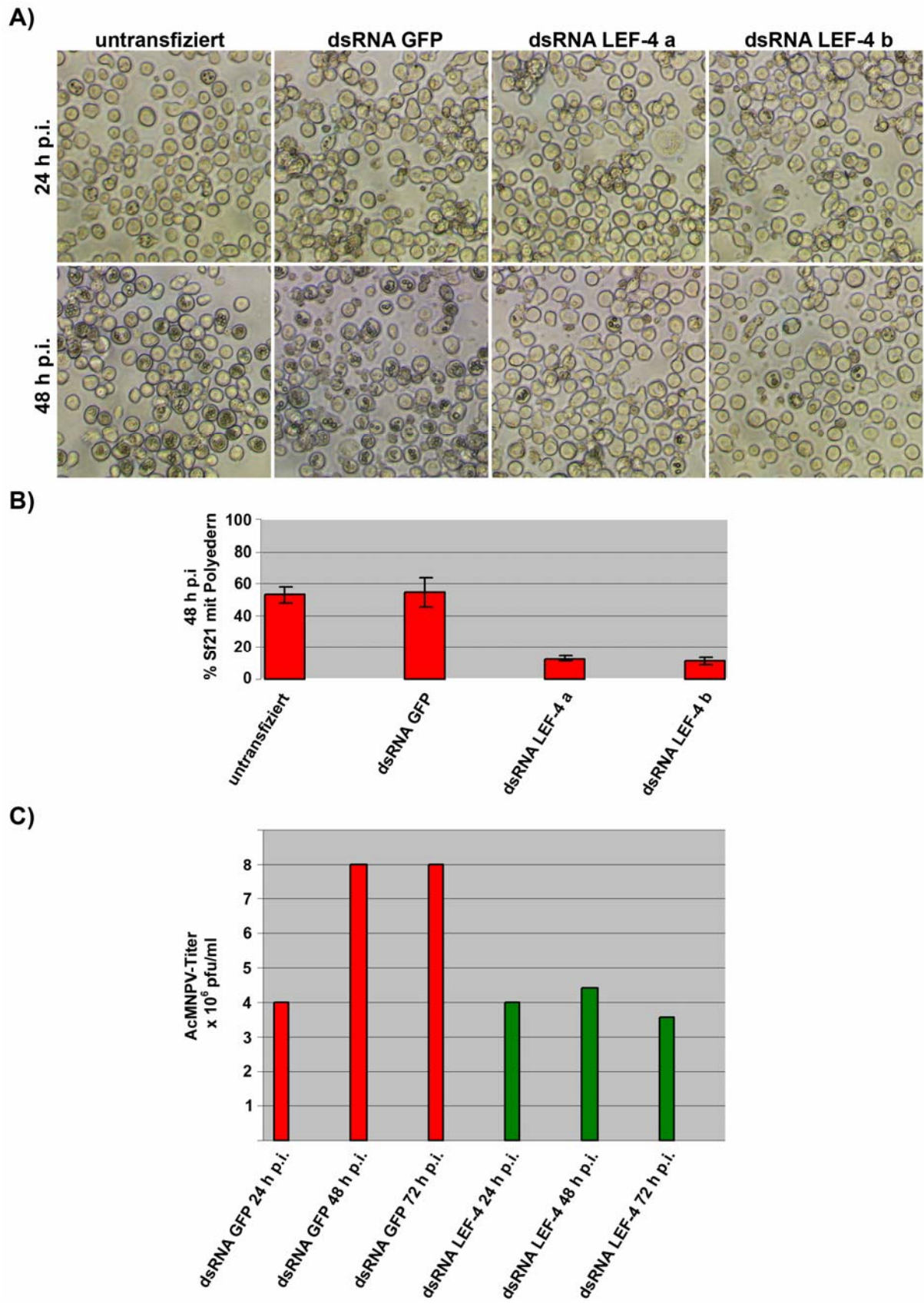


Abb. 33: Auswirkungen der LEF-4-Reduktion auf die Baculovirus-Polyederbildung und die Virusproduktion

Um zu untersuchen, ob neben dem Einschlusskörper-Phänotyp auch die Bildung des ins Zellkulturmedium sezernierten BV-Phänotyps von AcMNPV von der LEF-4-Synthese abhängig ist, wurden exemplarisch „Plaque-Test“-Analysen für ein RNAi-Experiment angefertigt. Dazu wurden Zellkulturüberstände 24, 48 und 72 h p.i. abgenommen und jeweils ein „Plaque-Test“ von dsRNA GFP- und dsRNA LEF-4-transfizierten Zellen für jeden Zeitwert durchgeführt (Abb. 33 C). Nach der Transfektion von dsRNA GFP wurde 24 h p.i. ein Virustiter von 4×10^6 pfu/ml und 48 bzw. 72 h p.i. jeweils ein Titer von ca. 8×10^6 pfu/ml erhalten. Die Überstände der mit dsRNA LEF-4 transfizierten Zellen zeigten 24 h p.i. ebenfalls einen Titer von 4×10^6 pfu/ml, der in diesem Fall aber bis in die sehr späte Infektionsphase bei 72 h p.i. annähernd konstant blieb. Dies bedeutet, dass 24 h p.i. noch keine Wirkung der LEF-4-Reduktion auf die ins Zellkulturmedium abgegebenen BVs festzustellen war, jedoch zu den noch späteren Infektionszeitpunkten 48 und 72 h p.i. eine Halbierung der Infektiosität der Überstände durch die LEF-4-Inhibition messbar war. Bei dem gemessenen Faktor von zwei handelt es sich nicht um eine dramatische Verringerung der BV-Produktion, welches darin begründet sein könnte, dass nicht alle Sf21-Zellen in der Gewebekulturschale mit dsRNA LEF-4 transfiziert wurden. Dennoch deutet dieses Ergebnis an, dass LEF-4 auch für die Bildung des BV-Phänotyps essentiell sein kann.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass LEF-4 sowohl ein essentieller Faktor für die späte und sehr späte virale Genexpression ist, als auch für die Produktion von baculoviralen Einschlusskörpern notwendig ist.

4.5. TBP-RNA-Interferenzstudien in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen

Durch die vorangegangenen RNAi-Studien über die baculoviralen Faktoren IE2, DBP und LEF-4 wurde die RNAi-Methode in Sf21-Zellen während des AcMNPV-Infektionsverlaufs etabliert. Im Anschluss sollte versucht werden die Technik auf den zellulären Transkriptionsfaktor TBP anzuwenden. Es war das Ziel durch eine Reduktion von TBP vor der Infektion bzw. mit einer Inhibition des TBP-Anstiegs während der Infektion Hinweise auf mögliche Funktionen der TBP-Zunahme für die späte und sehr späte AcMNPV-Infektion und damit für die Viruspolyederbildung zu erhalten.

Aus den Translationsinhibitionsstudien mit CHX in Sf21-Zellen ging hervor, dass TBP eine Stabilität von zumindest drei bis vier Tagen zu besitzen scheint (Ergebnisteil 2.1.). Anders als bei der Hemmung der Synthese eines viralen Faktors war somit fraglich, ob durch die

Verwendung der RNAi-Methode ein Einfluss auf die Menge eines stabilen zellulären Proteins sichtbar werden würde.

Es wurden dsRNAs TBP hergestellt, die 599 nt der N-terminalen Region bzw. 500 nt der C-terminalen Region des SfTBP-Gens entsprachen. Diese beiden dsRNAs TBP wurden gemischt und mit ihnen wurden Titrierungsversuche durchgeführt. In initialen RNAi-Analysen, bei denen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion von 5 µg des dsRNA TBP-Gemisches Proteinextrakte hergestellt wurden, war eine leichte Reduktion der TBP-Proteinmenge 72 h p.t. erkennbar (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden uninfectierte Sf21-Zellen mit verschiedenen Mengen des dsRNA TBP-Gemisches bzw. mit dsRNA GFP transfiziert oder blieben unbehandelt. 72 h p.t. wurden Proteinextrakte präpariert und TBP durch Western Blot-Analysen nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen wurde ein leichter Rückgang des TBP-Signals bei Verwendung von 25 und 50 µg des dsRNA TBP-Gemisches erkennbar (Abb. 34 A).

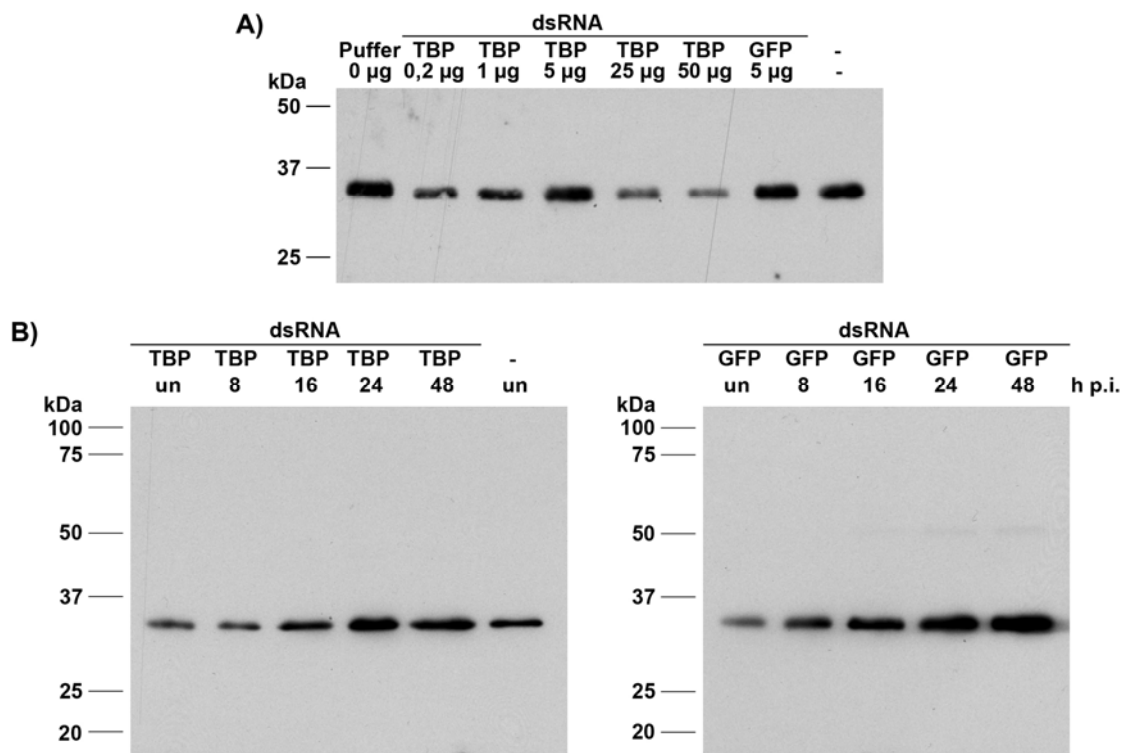


Abb. 34: Einfluss von RNAi auf TBP in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen: Erste Untersuchungen

A) 1×10^6 uninfectierte Sf21-Zellen wurden mit 0 µg, 0,2 µg, 1 µg, 5 µg, 25 µg oder 50 µg dsRNA TBP oder mit 5 µg dsRNA GFP transfiziert oder blieben untransfiziert (-). 72 h p.t. wurden nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. **B)** 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 25 µg dsRNA TBP (links) oder mit 5 µg dsRNA GFP (rechts) transfiziert oder blieben untransfiziert (-). Die Zellen wurden 48 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert (un). 8, 16, 24 und 48 h p.i. wurden nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 5 µl Zelleextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von TBP erfolgte mit polyklonalem anti-TBP (SA3890) Kaninchenserum. Die Proteinstandards sind jeweils links dargestellt.

Im Folgenden wurden RNAi-Studien durchgeführt, bei denen die TBP-Proteinmengen im AcMNPV-Infektionsverlauf nach Transfektion von 25 µg dsRNA TBP-Gemisch oder von 5 µg dsRNA GFP und nach Infektion der Zellen 48 h p.t. nachgewiesen wurden. Es konnte in beiden Transfektionsansätzen ein Anstieg der TBP-Proteinmenge in der späten Infektionsphase festgestellt werden (Abb. 34 B). Die TBP-Zunahme wurde somit kaum durch die dsRNA TBP beeinflusst. Auch in uninfizierten Sf21-Zellen, die 56 h p.t. geerntet worden waren, war keine TBP Reduktion durch dsRNA TBP erkennbar. Darüber hinaus konnte keine Wirkung der dsRNA TBP auf die Viruspolyederzahl 48 h p.i. beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund waren keine Auswirkungen auf die Expression viraler Faktoren zu erwarten und es wurden keine Expressionsanalysen von Virusproteinen durchgeführt.

Die fehlende Reduktion von TBP könnte einerseits in der großen Stabilität des TBP-Proteins begründet sein. Andererseits stellte sich die Frage, ob die synthetisierten dsRNAs TBP funktionsfähig waren. Für weitere RNAi-Studien über TBP wurden daher neue dsRNAs TBP synthetisiert. Um möglichen Degradationen einzelner dsRNAs zuvorzukommen, wurden die dsRNAs TBP jeweils doppelt hergestellt. Wiederum bestanden diese entweder aus 599 nt der N-terminalen Region oder aus 500 nt der C-terminalen Region des SfTBP-Gens.

Die Titrierung erfolgte unter Verwendung von jeweils 5 und 25 µg der neu synthetisierten dsRNAs TBP und mit Einsatz von Kombinationen der N- und C-terminalen dsRNAs TBP in Transfektionsstudien in Sf21-Zellen. 48 h p.t. wurden die Zellen für 24 Stunden mit AcMNPV infiziert. Die nachweisbare TBP-Menge war bei verschiedenen Versuchsansätzen etwas variabel (Abb. 35 A). Jedoch schien der Einsatz von 5 µg der N-terminalen dsRNA TBP (Abb. 35 A, Spur 1) und von 5 µg der C-terminalen dsRNAs TBP (Abb. 35 A, Spuren 5, 7) einen leichten Effekt auf die Abnahme des TBP-Proteins zu haben.

Nachfolgende Infektionsstudien wurden unter Verwendung von jeweils 5 µg von diesen neuen dsRNAs TBP des TBP N-Terminus (dsRNA TBP (N) Präparationsansatz a) und des C-Terminus (dsRNA TBP (C) Präparationsansatz a) in RNAi-Experimenten vorgenommen. Die transfizierten Sf21-Zellen wurden 48 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert.

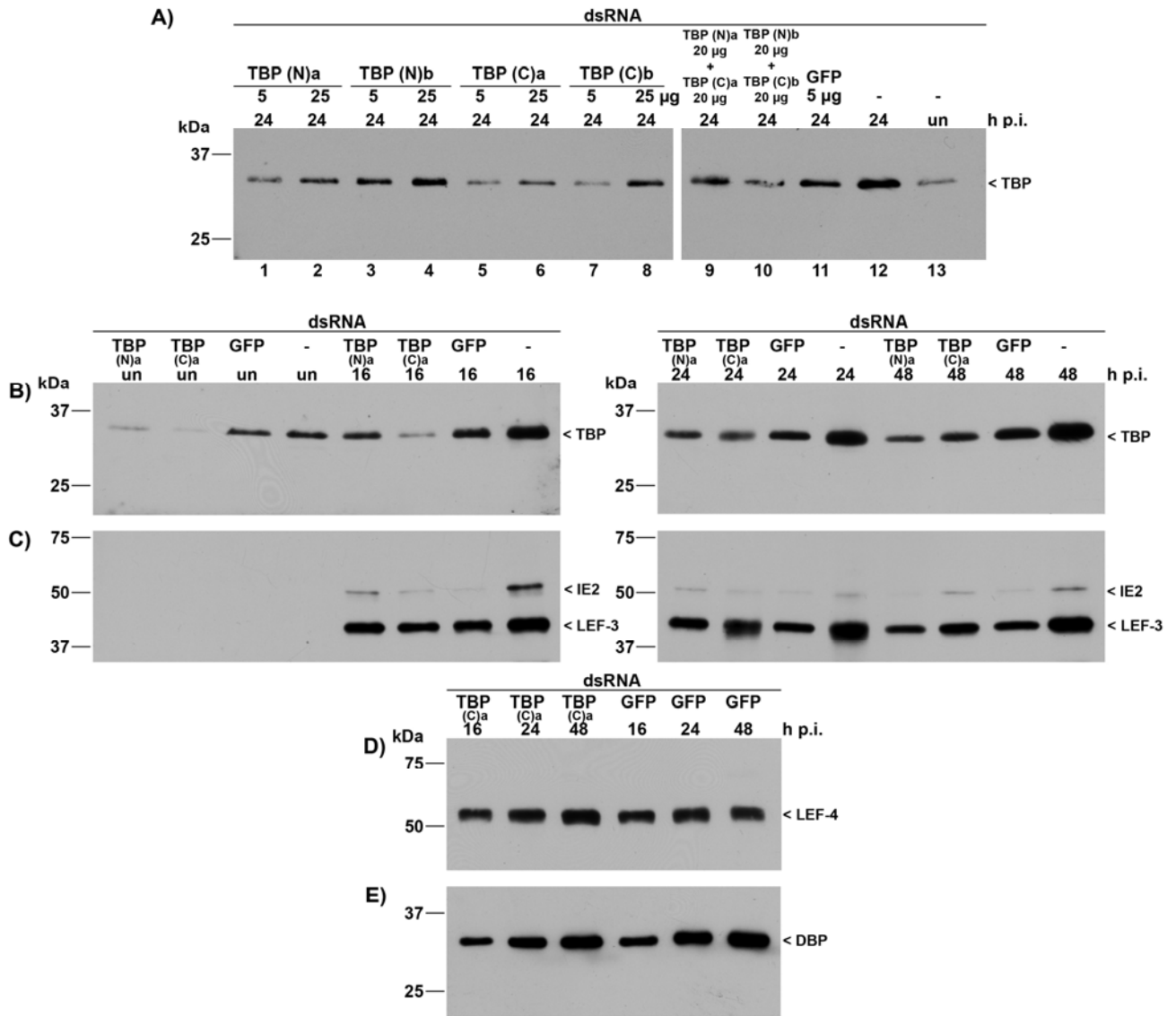


Abb. 35: Einfluss der RNAi-Methode auf TBP im baculoviralen Infektionsverlauf

A) 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 5 μ g oder 25 μ g dsRNA TBP oder mit 5 μ g dsRNA GFP transfiziert oder blieben untransfiziert (-). Es wurden jeweils zwei verschiedene dsRNA TBP Präparationen (a und b) für den N-terminalen (N) und C-terminalen (C) Bereich von TBP verwendet (Spuren 1-8). Zusätzlich wurden Kombinationen aus 20 μ g N-terminalen und 20 μ g C-terminalen dsRNAs TBP getestet (Spuren 9, 10). Die Zellen wurden 48 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert (un), und es erfolgte 24 h p.i. die Herstellung von nukleären Detergenzextrakten. **B-E)** 1×10^6 Sf21-Zellen wurden mit 5 μ g der in Teil A) getesteten dsRNAs TBP oder mit 5 μ g dsRNA GFP transfiziert oder blieben untransfiziert (-). Die Zellen wurden 48 h p.t. mit AcMNPV infiziert oder blieben uninfiziert (un). 16, 24 und 48 h p.i. wurden nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden jeweils 5 μ l Zellextrakt aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. TBP wurde mit polyklonalem anti-TBP (SA3890) Kaninchenserum (**A**, **B**), IE2 mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum (**C**), LEF-3 mit polyklonalem anti-LEF-3 Kaninchenserum (**C**), LEF-4 mit polyklonalem anti-LEF-4 Kaninchenserum (**D**) und DBP mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum (**E**) nachgewiesen. Die Inkubation der Membranen mit den gegen IE2 und LEF-3 (**C**) gerichteten Antikörpern erfolgte gleichzeitig. Die Pfeile markieren die spezifischen Proteinsignale. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

Die Herstellung von Proteinextrakten erfolgte 16, 24 und 48 h p.i., da das Interesse auf die Reduktion des TBP-Anstiegs in der späten Infektionsphase gerichtet war. Ohne Virusinfektion wurde deutlich, dass durch die Transfektionen von dsRNA TBP die TBP-Proteinmenge im Vergleich zu dsRNA GFP-transfizierten Zellen verringert werden konnte, wobei die uninfizierten Zellen 64 h p.t. geerntet worden waren (Abb. 35 B). Auch 16 h p.i. schien bei der dsRNA TBP für den C-Terminus eine Blockierung der TBP-Proteinsynthese stattzufinden (Abb. 35 B). In der sehr späten Infektionsphase 24 und 48 h p.i. wurden sehr schwache Reduktionseffekte der dsRNAs TBP im Vergleich zu den Transfektionen der dsRNA GFP beobachtet. Untransfizierte Zellen, die nicht dem Stress der Transfektion ausgesetzt waren, zeigten v.a. in den späten Infektionsphasen eine höhere Zelldichte und somit auch stärkere TBP-Proteinsignale in den Western Blot-Analysen (Abb. 35 B).

Trotz des geringen Effektes der TBP-Reduktion durch die RNAi-Methode wurden virale Faktoren auf ihre Proteinexpression hin untersucht. Wie in den Expressionsstudien zuvor (s. Ergebnisteil 4.2.) war das IE2-Protein 16 h p.i. nur noch schwach und zu späteren Infektionszeitpunkten kaum noch nachweisbar (Abb. 35 C). Die Expression des früh bis in die späte Infektionsphase exprimierten LEF-3-Proteins zeigte keine Unterschiede zwischen dsRNA TBP- und dsRNA GFP-behandelten Zellen (Abb. 35 C). Durch die Transfektion der dsRNAs TBP war auch keine Wirkung auf die Expressionen des DBP-Proteins oder des LEF-4-Proteins in der späten Infektionsphase nachweisbar (Abb. 35 D, E). Lichtmikroskopisch wurde untersucht, ob die dsRNA TBP-Transfektionen die Ausbildung von Viruspolyedern ab 24 h p.i. beeinflussen könnten. Dabei konnten keinerlei Unterschiede zwischen den mit dsRNA TBP und den mit dsRNA GFP-transfizierten Zellen ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis zeigt, dass es in den durchgeführten RNAi-Experimenten möglich war, die TBP-Proteinmenge in uninfizierten Sf21-Zellen zu reduzieren. In infizierten Zellen schien einzig die Transfektion der C-terminalen dsRNA TBP eine sichtbare Reduktion der TBP-Proteinmenge 16 h p.i. hervorzurufen. In der späten und sehr späten Infektionsphase, in der es zur starken TBP-Proteinzunahme während der AcMNPV-Infektion kommt, war jedoch in den meisten Versuchsansätzen keine deutliche Reduktion der TBP-Proteinsynthese durch die transfizierten dsRNAs TBP erreichbar. Einflüsse auf die hier untersuchten viralen Proteinexpressionen konnten nicht verzeichnet werden. Des Weiteren führte die Transfektion von dsRNA TBP zu keiner sichtbaren Reduktion der Entstehung von baculoviralen Einschlusskörpern.

5. Expressionsstudien über TAFs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Der TFIID-Komplex des basalen Transkriptionsapparates eukaryotischer Zellen besteht neben TBP aus mindestens zwölf bis vierzehn TBP-assoziierten Faktoren (TAFs). TAFs besitzen verschiedene Funktionen, wozu auch die Kontrolle der regulierbaren Transkription von Genen durch die RNAP II gehört (Übersichtsartikel Roeder, 1996; Lee und Young, 1998; Albright und Tjian, 2000; Werten et al., 2002; Walker und Blackwell, 2003).

Es wurden Studien durchgeführt, die die Expression von TAFs in den Insektenzelllinien Sf21 und TN-368 im baculoviralen Infektionsverlauf untersuchten. Dies sollte zur Klärung beitragen, ob die Expression von TAFs, ähnlich wie die von TBP, durch die AcMNPV-Infektion reguliert werden kann.

Da bisher keine gegen TAFs der Insektenordnung *Lepidoptera*, aus der die Zelllinien Sf21 und TN-368 stammen, gerichteten Antikörper zur Verfügung stehen, wurden gegen TAFs der Spezies *Drosophila melanogaster* (dmTAFs) aus der Insektenordnung *Diptera* gerichtete Antikörper getestet. Initiale Vergleichsstudien von verschiedenen anti-dmTAF-Antikörpern wurden in der *Drosophila* Schneider-Zelllinie und in Sf21- und TN-368-Zellen durchgeführt (Voß, 2003). Diese Antikörper und Antiseren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Dabei zeigte sich, dass die getesteten monoklonalen dmTAF-Antikörper und polyklonalen anti-dmTAF-Antiseren für die Verwendung in *Lepidopteren*-Zellen zum größten Teil nicht geeignet waren, da sie in Western Blot-Studien kein Protein mit dem vorhergesagten Molekulargewicht erkannten bzw. viele unspezifische Hintergrundsignale detektierten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit weitere zur Verfügung gestellte anti-dmTAF-Antiseren auf ihre Verwendbarkeit in AcMNPV infizierten *Lepidopteren*-Zellen ausgetestet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die im Jahr 2002 eingeführte, einheitliche und allgemein gültige Nomenklatur für TAFs aus verschiedenen Spezies verwendet (Tora, 2002), wobei zu Beginn einmalig die alte Bezeichnung genannt wird.

5.1. Expressionsanalysen von TAF9 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Das polyklonale anti-dmTAF9-Kaninchenserum ist gegen TAF9 (TAF_{II}42) aus *Drosophila melanogaster* gerichtet (S. Georgieva, Moskau). Es wurde zunächst auf seine Spezifität hin in *Drosophila* Schneiderzellextrakten getestet. Dabei war ein Hauptsignal bei 40 bis 42 kDa zu erkennen, welches dem vorhergesagten TAF9-Molekulargewicht entsprach (Daten nicht

gezeigt). Anschließend wurden aus uninfizierten und AcMNPV-infizierten Zellen 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. Proteinextrakte hergestellt, um die Expression von TAF9 in TN-368- und Sf21-Zellen zu testen. Das anti-dmTAF9-Kaninchenserum erkannte in beiden Zelllinien Signale im Molekulargewichtsbereich von 40 bis 42 kDa (Abb. 36 A, B, s. Pfeile). Diese Proteinbanden konnten in beiden Zelllinien ausschließlich in der späten Infektionsphase ab 16 h p.i. festgestellt werden und nahmen leicht bis 48 bzw. 72 h p.i. zu. In der frühen Infektionsphase und in uninfizierten Zellen war auch bei längerer Exposition der Filme kein Signal im Bereich von 40 kDa erkennbar. Das verwendete Antiserum erkannte darüber hinaus weitere Proteinbanden. In TN-368-Zellen war dies v.a. eine Bande bei ca. 29 kDa in der sehr späten Infektionsphase, die dem Polyhedrin-Protein entsprechen dürfte (Abb. 36 A, s. Stern). Auch einzelne Banden im Gelbereich von ca. 30 kDa bzw. um 50 kDa und bei ca. 170 kDa wurden mehr oder weniger stark detektiert. In Sf21-Zellen lag das Hauptsignal, das vom anti-dmTAF9-Kaninchenserum erkannt wurde, bei ca. 55 kDa und es gab Wechselwirkungen mit Proteinen im Größenbereich von ca. 27 bis 30 kDa, bei 150 kDa, sowie in der sehr späten Infektionsphase mit dem mutmaßlichen 29 kDa Signal des Polyhedrins (Abb. 36 B, s. Stern). Der Nachweis des Signals bei ca. 40 kDa war parallel auch in den zytoplasmatischen Detergenzfraktionen der späten Infektionsphase deutlich möglich, was eher gegen die Spezifität als TAF9-Signal spricht (Daten nicht gezeigt).

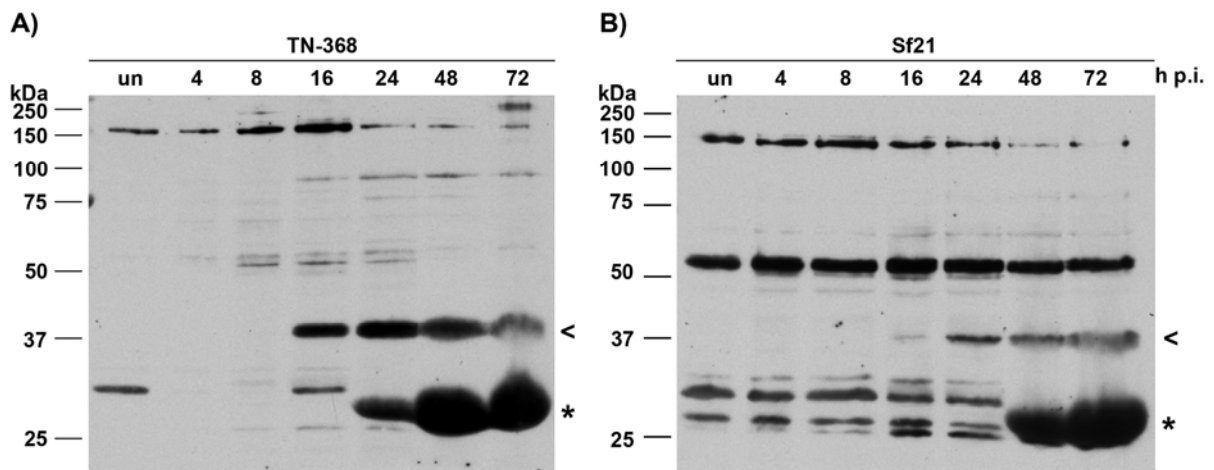


Abb. 36: Analyse der TAF9-Expression im baculoviralen Infektionsverlauf

Aus uninfizierten (un) und AcMNPV-infizierten 2×10^6 Sf21-Zellen und 6×10^5 TN-368-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 12 μ l TN-368-Zelleextrakt (A) oder 10 μ l Sf21-Zelleextrakt (B) aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von TAF9 wurde mit polyklonalem anti-dmTAF9-Kaninchenserum durchgeführt. Die Proteinstandards sind jeweils links angegeben. Die Pfeile markieren Signale, die dem berechneten Molekulargewicht von TAF9 entsprechen, und die Sterne zeigen mutmaßliche Signale des Polyhedrins an.

Somit zeigte sich ein vom anti-dmTAF9-Antiserum nachgewiesenes Signal bei ca. 40 kDa in beiden Zelllinien nur in der späten Infektionsphase und damit parallel zum Anstieg des TBP-Proteins. Allerdings konnte dieses Signal in uninfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Expression von TAF9 so gering ist, dass sie mit dem vorhandenen Antiserum nicht nachweisbar ist. Es kann jedoch auch auf die fehlende Spezifität des Serums zurückzuführen sein, dass TAF9 in Sf21- und TN-368-Zellen nicht nachweisbar ist.

5.2. Expressionsanalysen von TAF5 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Aus initialen Teststudien ging hervor, dass das polyklonale anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) das Potential besitzen könnte, in Sf21-Zellen spezifisch das TAF5 (TAF_{II}85)-Protein zu erkennen (Voß, 2003). Davon ausgehend wurden weitere Analysen über TAF5 im baculoviralen Infektionsverlauf durchgeführt.

Das anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) erkannte in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen eine Proteinbande von ca. 90 kDa, die damit etwas über dem vorhergesagten TAF5-Molekulargewicht von 85 kDa lag (Abb. 37 A, s. Pfeil). Diese Bande war ausschließlich in der späten Infektionsphase ab 16 h p.i. und in der Intensität gleich bleibend bis 72 h p.i. nachweisbar, jedoch nicht in der frühen Phase der Infektion und in uninfizierten Zellen. Ein weiteres Signal wurde bei ca. 120 kDa erkannt. In Sf21-Zellen wurde eine Proteinbande von ca. 85 kDa gleich bleibend im gesamten Infektionsverlauf detektiert. Zusätzlich konnte eine Bande bei ca. 90 kDa nachgewiesen werden, die erst ab 16 h p.i. von dem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) erkannt wurde (Abb. 37 B, s. Pfeil). Eine zusätzliche Proteinbande wurde im Bereich von 150 kDa nachgewiesen.

Zum Vergleich wurde das anti-dmTAF5-Kaninchenserum (III) getestet, welches wie das zuvor beschriebene Antiserum von Y. Nakatani (Boston, USA) zur Verfügung gestellt worden war. Dieses anti-dmTAF5-Kaninchenserum (III) erkannte in TN-368-Zellen und in Sf21-Zellen eine Proteinbande, die etwas höher als die vom anti-dmTAF5-Antiserum (a) erkannte Bande im SDS-Polyacrylamidgel lief (Abb. 37 C, D, s. Pfeile). Dieses Signal wurde zu allen Infektionszeitpunkten und in uninfizierten Zellen erkannt und schien in TN-368-Zellen gleich bleibend zu verlaufen, während in Sf21-Zellen ein leichter Anstieg bei 48 und 72 h p.i. zu verzeichnen war. Des Weiteren erkannte dieses Antiserum zusätzliche unspezifische Signale in beiden Zelllinien in der späten Infektionsphase v.a. im niedermolekularen Bereich unter 50 kDa.

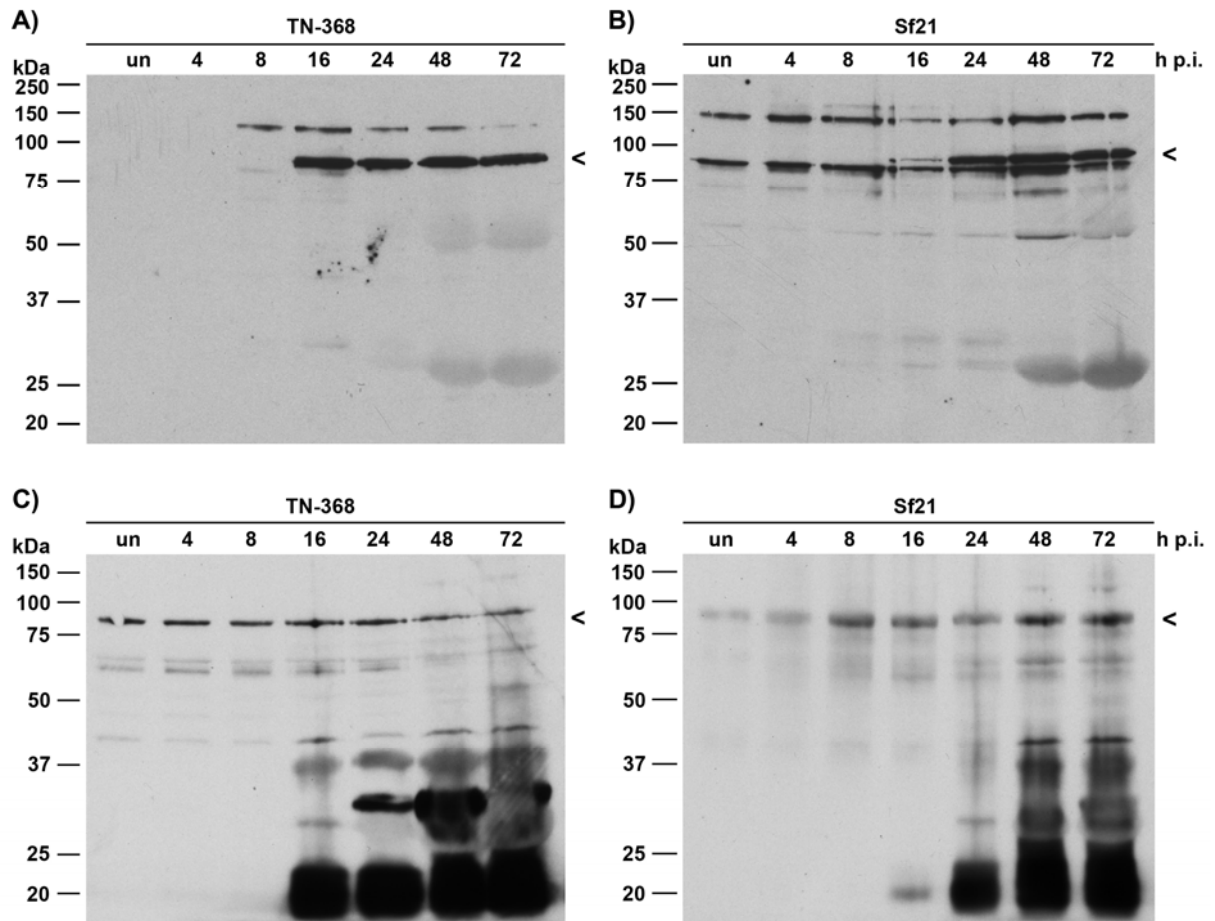


Abb. 37: Analyse der TAF5-Expression im AcMNPV-Infektionsverlauf

Aus uninfizierten (un) oder AcMNPV-infizierten 6×10^5 TN-368-Zellen und 2×10^6 Sf21-Zellen wurden 4, 8, 16, 24, 48 und 72 h p.i. nukleäre Detergenzextrakte hergestellt. Pro Spur wurden 12 μ l TN-368-Zellextrakte (**A**, **C**) oder 5 μ l Sf21-Zellextrakte (**B**, **D**) aufgetragen und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis von TAF5 wurde mit polyklonalem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) (**A**, **B**) oder mit polyklonalem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (III) (**C**, **D**) durchgeführt. Die Proteinstandards sind jeweils links angegeben.

Wie für das anti-dmTAF9-Antiserum beschrieben (Ergebnisteil 5.1.), konnte auch mit dem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) eine Proteinbande detektiert werden, die ungefähr im Bereich des berechneten Molekulargewichts des Proteins lag und erst in der späten Infektionsphase, und somit parallel zum TBP-Anstieg, nachgewiesen werden konnte. Anders als in TN-368-Zellen trat diese Bande in Sf21-Zellen allerdings als oberes Signal einer Doppelbande auf.

Somit könnte es sein, dass auch die TAF5-Expression durch die Baculovirusinfektion auf ein sichtbares Niveau gehoben wird, wobei die Spezifität des Signals zweifelhaft bleibt, da in uninfizierten Zellen auch nach längerer Expositionszeit der Filme kein Signal nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse waren mit dem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (III) nicht reproduzierbar.

5.3. Lokalisierungsstudien von TAF5 im baculoviralen Infektionsverlauf

Es wurden initiale Lokalisierungsstudien für TAF5 vorgenommen, die nur mit dem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) in TN-368-Zellen möglich waren. In Kolokalisierungsstudien mit BrdU-markierten viralen DNA-Replikationszentren zeigten sich in einem Teil der Zellen ab 4 h p.i. erste hellere Kernbereiche, die mit den entstehenden Orten der viralen DNA-Synthese kolokalisierten (Abb. 38). Diese helleren Kerndomänen nahmen während des Infektionsverlaufs an Größe zu, bis nur eine große Kerndomäne ab 16 h p.i. beobachtet werden konnte. Dabei war auch zu den späteren Infektionszeitpunkten bei 8, 16 und 24 h p.i. eine Überlagerung mit den Bereichen der viralen DNA-Replikation in den konfokalen Mirkroskopaufnahmen nachweisbar (Abb. 38).

Somit konnten mit dem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) Kernstrukturen angefärbt werden, die während der AcMNPV-Infektion in den gleichen Kernbereichen zu finden waren wie die TBP-Kernstrukturen. Der Nachweis der Kernstrukturen ab 4 h p.i. steht im Gegensatz zu der Nachweisbarkeit der TAF5-Expression in Western Blot-Analysen, in denen erst 16 h p.i. TAF5 beobachtet wurde.

Die hier vorgestellten Expressions- und Lokalisierungsstudien über TAFs im baculoviralen Infektionsverlauf zeigen, dass Signale im Bereich der berechneten Molekulargewichte nur bei Verwendung der anti-dmTAF9 und anti-dmTAF5 Antiseren nachzuweisen sind. Die erhaltenen Ergebnisse deuten an, dass TAF5 und TAF9 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen in der späten Infektionsphase verstärkt exprimiert werden könnten. Darüber hinaus ist nur ein anti-dmTAF5-Antiserum geeignet, um Lokalisierungsstudien in TN-368-Zellen durchzuführen. Dabei verlief eine Relokalisierung der Kernsignale parallel mit der zeitlichen TBP-Umstrukturierung im Infektionsverlauf. Möglicherweise sind die Homologien der TAFs der Insektenordnungen *Diptera* und *Lepidoptera* nicht groß genug, um mit gegen *Drosophila*-TAFs gerichteten Antikörpern in *Lepidopteren*-Zellen spezifische Signale nachweisen zu können.

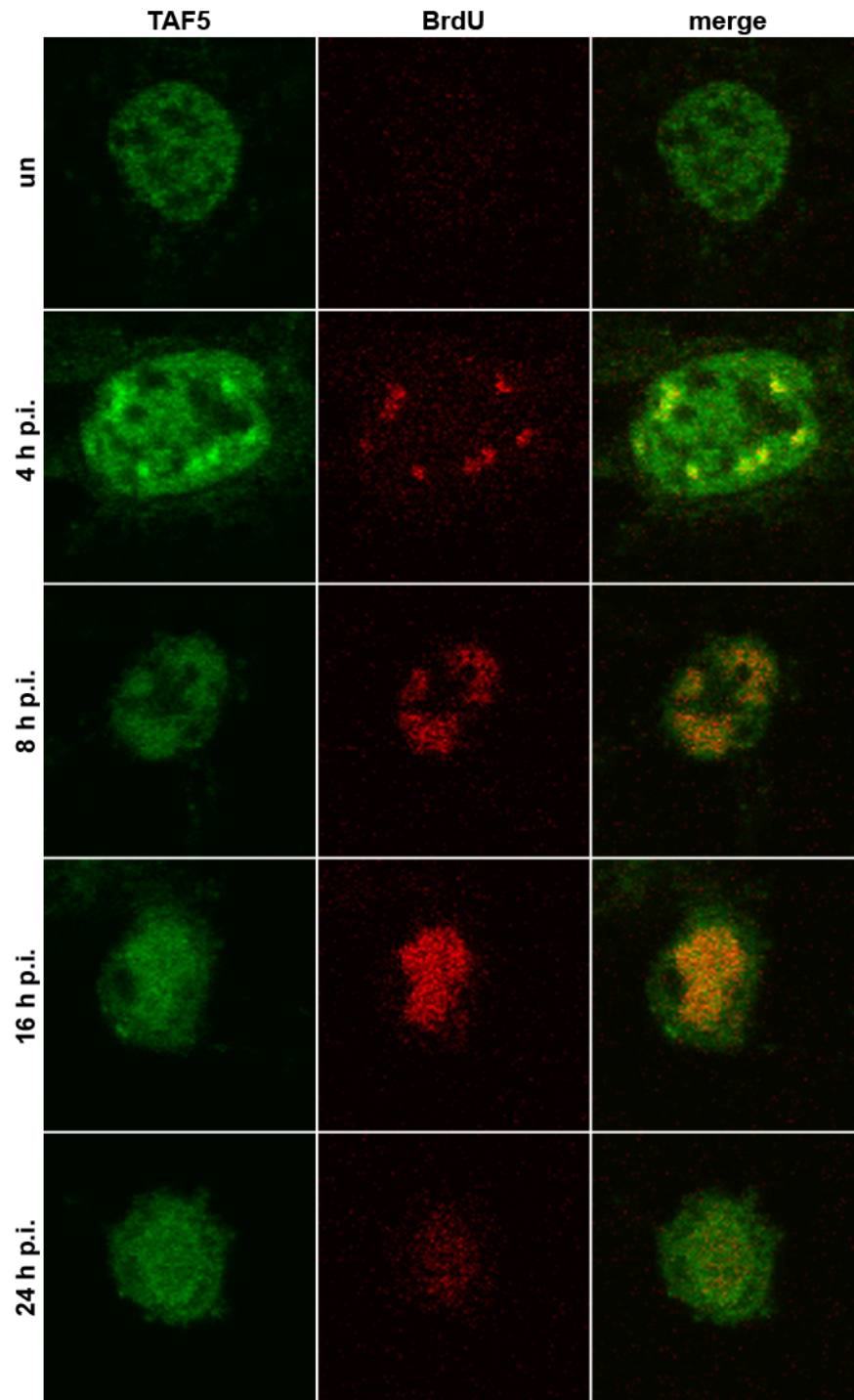


Abb. 38: Kolokalisierungsstudien von TAF5 und BrdU-markierten Replikationszentren im baculoviralen Infektionsverlauf

Uninfizierte und AcMNPV-infizierte TN-368-Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert. Die BrdU-markierten Zellen wurden 4, 8, 16 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von TAF5 wurden die Zellen mit polyklonalem anti-dmTAF5-Kaninchenserum (a) und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU-Antikörper (Maus) inkubiert. TAF5 wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und BrdU mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Signale einer Zelle in konfokalen Aufnahmen ist rechts dargestellt (merge).

6. Lokalisierungs- und Expressionsstudien über TBP und TAFs im HSV-1-Infektionsverlauf

Zur Klärung der Frage, ob die Infektion eines anderen großen DNA-Virus ebenfalls zu einer verstärkten Expression basaler Transkriptionsfaktoren und einer Umstrukturierung der TFIID-Untereinheiten TBP und TAFs in virale DNA-Replikationszentren führt, wurden Infektionsstudien in *Herpes simplex* Virus Typ 1 (HSV-1)-infizierten Zellen durchgeführt. Die Studien erfolgten in primären humanen Fibroblasten (HFFF2-Zellen), da diese eine optimale Visualisierung von viralen Replikationszentren ermöglichen.

6.1. Expressionsanalysen basaler Transkriptionsfaktoren und Lokalisierungsstudien über TBP in HSV-1-infizierten primären Fibroblasten

Zur Analyse der Expression von TBP und verschiedenen TAFs während der HSV-1-Infektion wurden aus uninfizierten und HSV-1-infizierten HFFF2-Zellen 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h p.i. Gesamtzellextrakte hergestellt. Die in Western Blot-Studien verwendeten Antikörper waren gegen humanes TBP bzw. humane TAFs (hsTAFs) gerichtet und erkannten jeweils Proteine, die dem vorhergesagten Molekulargewicht entsprachen. Die Benennung der TAFs erfolgte nach der Nomenklatur von Tora, 2002, wobei zunächst die alten Bezeichnungen angegeben sind.

Nach Verwendung des polyklonalen anti-TBP-Kaninchenserums (sc-204) konnte bis 16 h p.i. eine nahezu konstante Proteinmenge für TBP nachgewiesen werden, die erst in der sehr späten Infektionsphase abnahm (Abb. 39 A). Auch die Proteinmengen von hsTAF1 (TAF_{II}250), hsTAF4 (TAF_{II}135) und hsTAF5 (TAF_{II}100) blieben bis 16 h p.i. unverändert während der Infektion mit einer mehr oder weniger deutlichen Reduktion ab 24 h p.i. (Abb. 39 A). Nur für hsTAF7 (TAF_{II}55) konnte eine Abnahme bereits 4 bis 8 h p.i. festgestellt werden. Die hier gezeigte Membran wurde mit einem monoklonalen TBP-Antikörper (3G3) redetektiert, wodurch die vorgezogene Reduktion von hsTAF-7 deutlicher wurde, die allerdings nicht in allen Experimenten zu beobachten war. Die Analysen der hsTAF12 (TAF_{II}20) und hsTAF13 (TAF_{II}18) bestätigten die konstanten Proteinmengen von TFIID-Komponenten im HSV-1-Infektionsverlauf, wobei die Detektion dieser beiden hsTAFs mit geringen Molekulargewichten von 20 bzw. 18 kDa nur schwach möglich war (Abb. 39 A). Die Abnahme der Proteinmengen ab 24 h p.i. kann mit der generellen Reduktion der zellulären Genexpression während der Virusinfektion und der einsetzenden Lyse der Zellen

zu diesem späten Infektionszeitpunkt erklärt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die HSV-1-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TFIID-Komponenten bis 16 h p.i. hat.

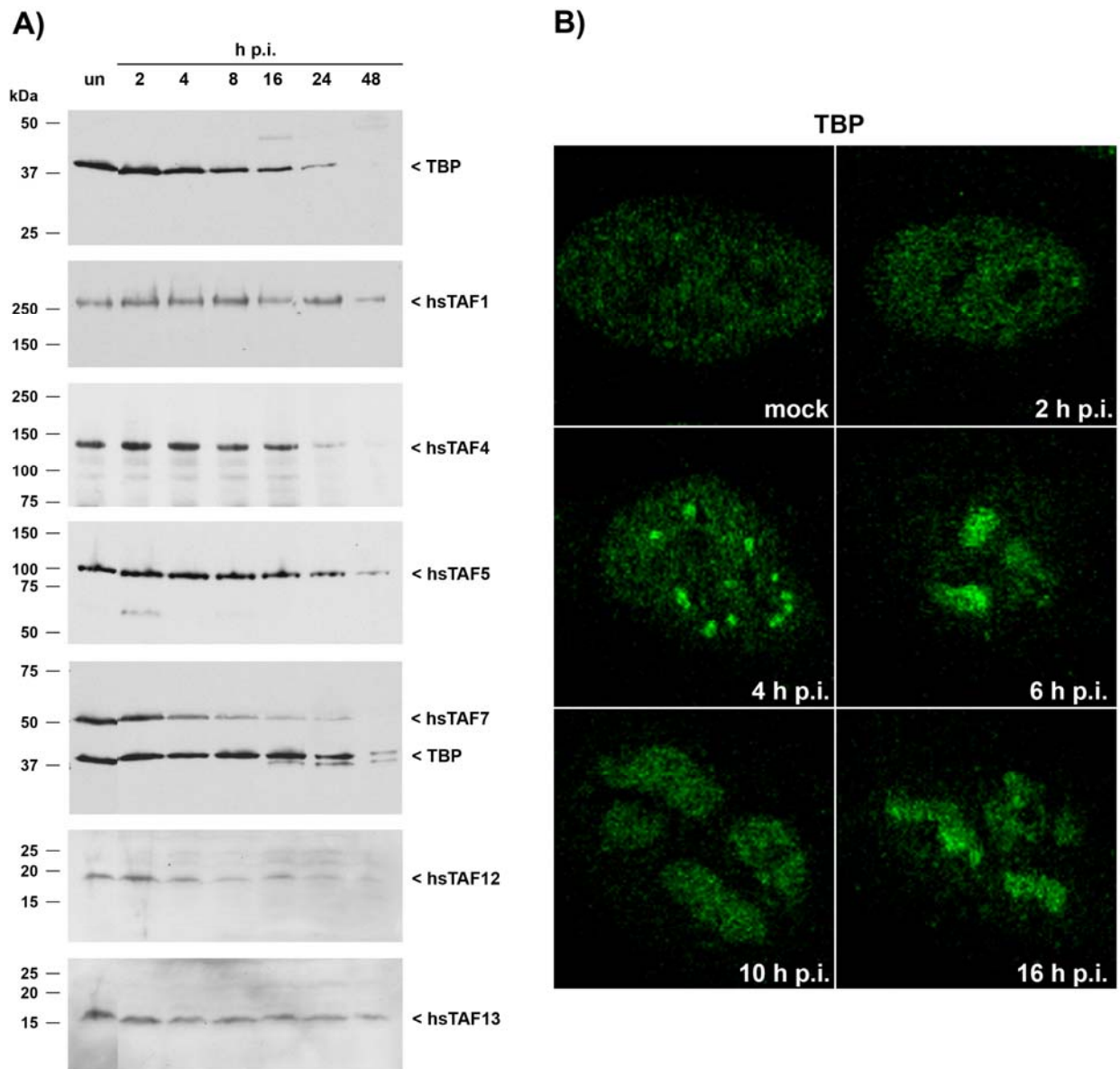


Abb. 39: Nachweis der Expression basaler Transkriptionsfaktoren und Lokalisierung von TBP im HSV-1-Infektionsverlauf

A) Zum Nachweis der Expression von basalen Transkriptionsfaktoren durch Western Blot-Analysen wurden aus uninfizierten (un) oder HSV-1-infizierten HFFF2-Zellen 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h p.i. Gesamtzellextrakte hergestellt. Pro Spur wurden zwischen 6 und 12 µl Zellextrakt aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden auf 8 oder 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit polyklonalem anti-TBP Kaninchenserum (sc-204), monoklonalem hsTAF1-Antikörper (sc-735) (Maus), monoklonalem hsTAF4-Antikörper (32TA) (Maus), polyklonalem anti-hsTAF5 Kaninchenserum, monoklonalem hsTAF12-Antikörper (22TA) und monoklonalem hsTAF13-Antikörper (16TA). HsTAF7 wurde mit monoklonalem hsTAF7-Antikörper (19TA) nachgewiesen und die Membran mit monoklonalem TBP-Antikörper (3G3) (Maus) redetektiert. Die Pfeile markieren die spezifischen Proteinsignale. Die Proteinstandards sind links aufgeführt. **B)** HFFF2-Zellen wurden mit HSV-1 infiziert oder mock-infiziert und 2, 4, 6, 10 und 16 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung von TBP wurde mit monoklonalem TBP-Antikörper (3G3) und Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Es sind konfokale Mikroskopieaufnahmen dargestellt.

Um die nukleäre Verteilung von TBP im HSV-1-Infektionsverlauf zu überprüfen, wurden Lokalisierungsstudien durchgeführt. Dazu wurden HFFF2-Zellen entweder mit HSV-1 infiziert oder mock-infiziert. In mock-infizierten Zellen zeigte sich ein granuläres TBP-Färbemuster im gesamten Zellkern (Abb. 39 B). Ab 2 h p.i. traten die ersten Veränderungen auf, so dass TBP in einigen Zellen in feinen punktierten Kernstrukturen zu finden war, die größer wurden und 4 h p.i. in fast allen Zellen zu beobachten waren. Diese TBP-Kerndomänen nahmen bis 6 und 10 h p.i. weiter an Größe zu. TBP war bis 16 h p.i. in diesen vergrößerten Strukturen im Zellkern zu finden (Abb. 39 B).

Hierdurch wurde ersichtlich, dass im HSV-1-Infektionszyklus, ähnlich wie während der Baculovirusinfektion, eine Relokalisierung von TBP in Kerndomänen stattfindet. Diese Beobachtung wurde auch in HSV-1-infizierten HeLa-Zellen gemacht (Voß, 2003).

6.2. Kolokalisierung von HSV-1 ICP4 mit viralen Replikationszentren

Während der produktiven, lytischen HSV-1-Infektion findet die virale Transkription, DNA-Replikation und der Zusammenbau neuer Viruskapside im Zellkern statt. Die HSV-1-DNA-Replikation geschieht in Replikationszentren, für die gezeigt werden konnte, dass sie mit Bereichen viraler Transkription überlagern (Rice et al., 1994; Phelan et al., 1997). Dabei kolokalisiert der sehr früh exprimierte, virale Transaktivator ICP4 („infected cell protein 4“) in Zentren viraler DNA-Synthese und mit Stellen viraler Transkription (Besse et al., 1995; Zhong und Hayward, 1997).

Um ICP4 als Marker für virale DNA-Replikationszentren nutzen zu können, wurde zunächst die Kolokalisierung von ICP4 mit viralen DNA-Replikationszentren überprüft. Im Zeitverlauf wurde deutlich, dass die BrdU-markierten Replikationszentren von 4 bis 16 h p.i. an Größe zunahmen und dabei mit den ausgebildeten ICP4-Kerndomänen übereinstimmten (Abb. 40).

In nachfolgenden Kolokalisierungsstudien konnte ICP4 sowohl als Marker für die frühe virale Genexpression als auch für virale Replikationszentren verwendet werden.

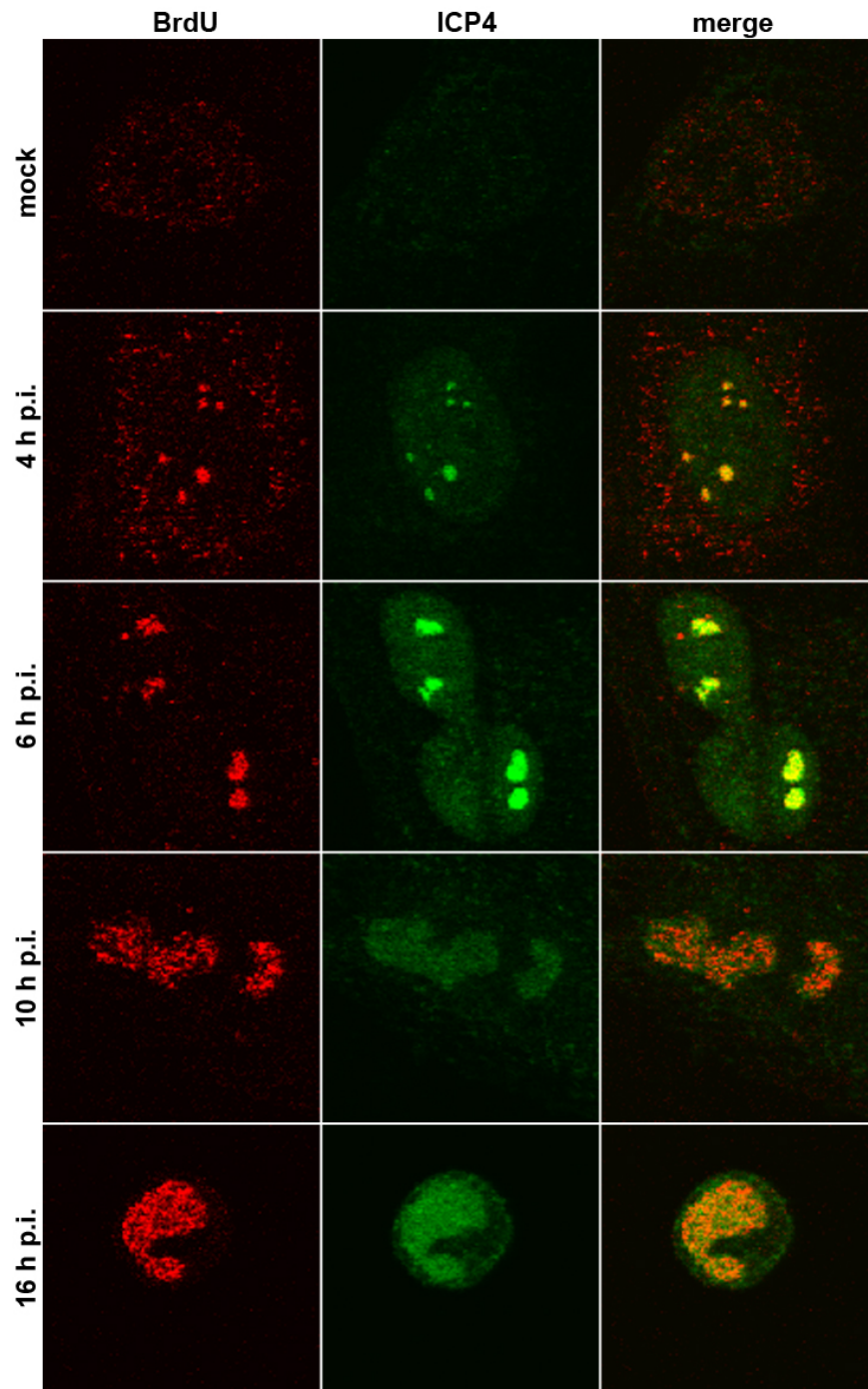


Abb. 40: Lokalisierung von ICP4 in BrdU-markierten Replikationszentren im HSV-1-Infektionsverlauf

Mock-infizierte oder HSV-1-infizierte HFFF2-Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert. Die BrdU-markierten Zellen wurden 4, 6, 10 und 16 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von ICP4 wurden die Zellen mit polyklonalem anti-ICP4 Kaninchenserum und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU-Antikörper (Maus) inkubiert. ICP4 wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und BrdU mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der konfokalen Signale einer Zelle ist dargestellt (merge).

6.3. Kolokalisierung von RNAP II mit ICP4 in HSV-1-infizierten HFFF2-Zellen

Die DNA von HSV-1 wird während des gesamten Infektionszyklus von der zellulären RNA-Polymerase II (RNAP II) transkribiert. Zur Optimierung der viralen Genexpression bewirkt das Virus eine Umwandlung von der zellulären zur viralen RNAP II-Transkription. Dabei wird die RNAP II in virale DNA-Replikationskompartimente rekrutiert und die Phosphorylierung der großen RNAP II-Untereinheit wird verändert (Rice et al., 1994, 1995; Leopardi et al., 1997; Spencer et al., 1997).

Als Vorbereitung für Lokalisierungsstudien mit basalen Transkriptionsfaktoren sollte die Relokalisierung der RNAP II im HSV-1-Infektionsverlauf überprüft werden. Dabei war in mock-infizierten HFFF2-Zellen und 1 h p.i. ein diffuses bzw. granuläres Färbemuster, verteilt auf den ganzen Zellkern, auszumachen (Abb. 41). Ab 2 h p.i. war die RNAP II in kleinen Kerndomänen zu beobachten, die mit ICP4 kolokalisierten und sich simultan 4 und 6 h p.i. vergrößerten (Abb. 41). Damit konnte in diesen Experimenten die Relokalisierung der RNAP II in virale Replikationszentren ab 2 h p.i. bestätigt werden.

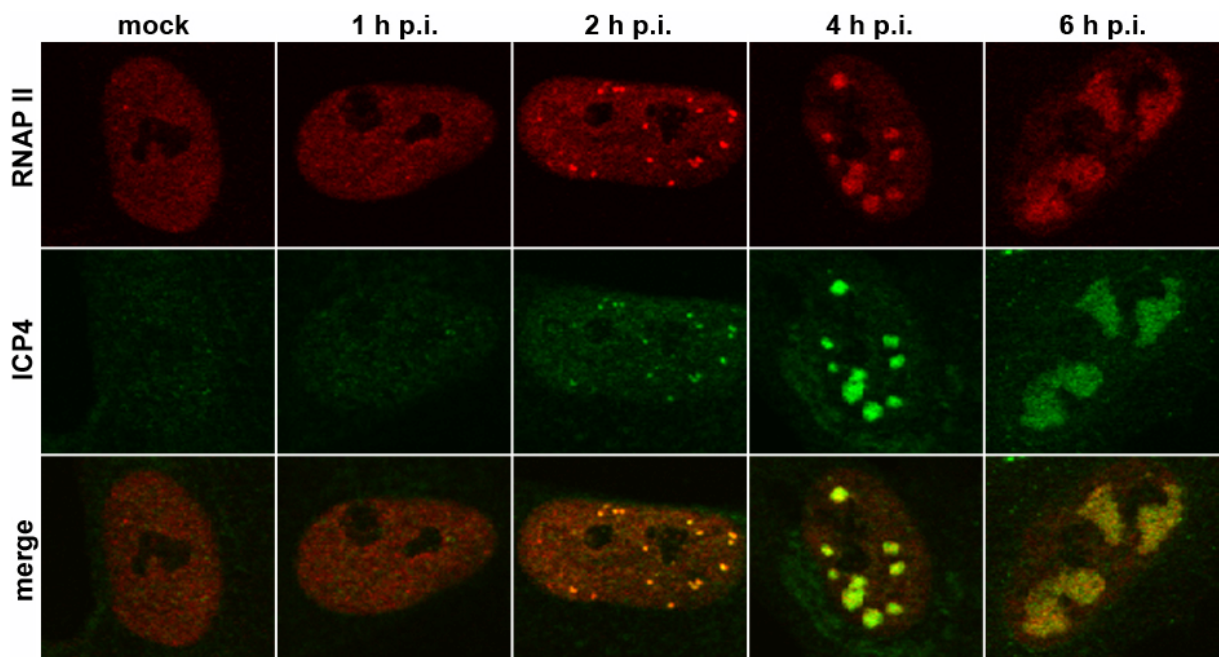


Abb. 41: Kolokalisierung von ICP4 und RNAP II im HSV-1-Infektionsverlauf

HFFF2-Zellen wurden mit HSV-1 infiziert oder mock-infiziert und 1, 2, 4 und 6 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. ICP4 wurde mit polyklonalem anti-ICP4 Kaninchenserum und RNAP II mit monoklonalem RNAP II-Antikörper (7C2) (Maus) nachgewiesen. Dabei wurde ICP4 mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und RNAP II mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Die Überlagerung der konfokalen Signale einer Zelle ist dargestellt (merge), wobei gelbe Signale Kolokalisierung anzeigen.

Ab 4 h p.i. färbte das polyklonale anti-ICP4 Kaninchenserum in allen Experimenten Strukturen am Rand der Zellkerne an (Abb. 41). Dabei handelte es sich um eine unspezifische Wechselwirkung mit dem HSV-1 gE-Protein, welches eine Affinität für die Fc-Region von Kaninchen-IgG besitzt (Baucke und Spear, 1979).

6.4. Kolokalisierungsstudien über TBP im HSV-1-Infektionsverlauf

Um zu überprüfen, ob die Relokalisierung von TBP im HSV-1-Infektionsverlauf ebenfalls mit einer Rekrutierung in virale Replikationszentren verbunden ist, wurden Kolokalisierungsstudien von TBP und ICP4 durchgeführt. Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus der TBP-Umstrukturierung wurde darüber hinaus die Abhängigkeit der TBP-Lokalisierung von der viralen DNA-Replikation analysiert.

6.4.1. Titrierungsstudien des Virus-DNA-Replikationsinhibitors PAA

Um die Ausbildung viraler DNA-Replikationszentren hemmen zu können, wurden Titrierungen des Virus-Replikationshemmers PAA („phosphonoacetic acid“) durchgeführt. Mock-infizierte und HSV-1-infizierte HFFF2-Zellen wurden 1 h p.i. mit verschiedenen Konzentrationen von 0, 20, 100, 300 oder 500 µg/ml PAA behandelt. Die Bildung von BrdU-markierten Replikationszentren wurde 4, 6 und 8 h p.i. überprüft (Abb. 42). Aktive virale DNA-Replikation wurde durch 20 µg/ml PAA nicht behindert, während unter Verwendung von 100 µg/ml PAA eine Verzögerung der einsetzenden viralen DNA-Synthese von 4 h p.i. nach 6 h p.i. zu beobachten war. Nach Behandlung der Zellen mit 300 und 500 µg/ml PAA entstanden bis zum untersuchten Zeitpunkt von 8 h p.i. keine viralen Replikationszentren (Abb. 42).

Somit konnte gezeigt werden, dass in HFFF2-Zellen der Einsatz von 300 µg/ml PAA ausreichend ist, um die Ausbildung viraler DNA-Replikationszentren bis zur späten HSV-1-Infektionsphase zu blockieren. Dies korreliert mit beschriebenen PAA-Verwendungen für die HSV-1-Replikationshemmung (Schang et al., 1998).

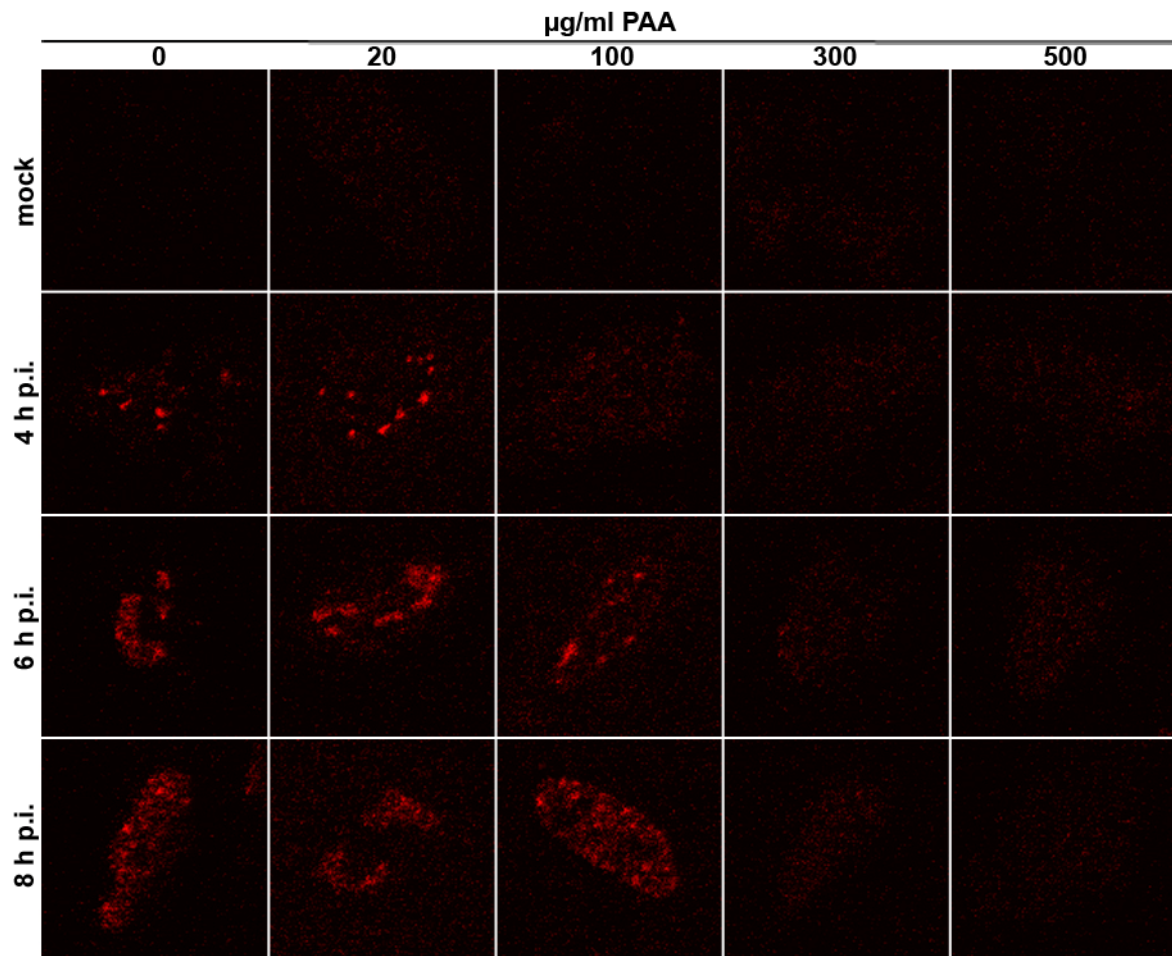


Abb. 42: Titrierung des Virus-Replikationsinhibitors PAA während der HSV-1-Infektion

Mock-infizierte oder HSV-1-infizierte HFFF2-Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert. Die Behandlung mit 0, 20, 100, 300 oder 500 µg/ml PAA erfolgte 1 h p.i. und die Zellen wurden 4, 6 und 8 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung von BrdU wurde mit monoklonalem BrdU-Antikörper und Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten durch konfokale Mikroskopie.

6.4.2. Kolokalisierung von TBP und ICP4 in HSV-1-infizierten primären Fibroblasten

Für Kolokalisierungsstudien von TBP mit HSV-1 ICP4 wurden unbehandelte und ab 1 h p.i. mit 300 µg/ml PAA inkubierte HFFF2-Zellen 2, 4 und 6 h p.i. fixiert. In mock-infizierten Zellen war TBP wiederum granulär im ganzen Kern verteilt. Sobald ICP4 ab 2 h p.i. in nukleären Strukturen lokalisierte, konnte eine Kolokalisierung mit TBP durch konfokale Mikroskopie beobachtet werden (Abb. 43). ICP4-Strukturen ohne eine kolokalisierende TBP-Struktur waren selten zu finden. Ohne Replikationsinhibitor nahmen 4 und 6 h p.i. sowohl die TBP- als auch die ICP4-Kerndomänen an Größe zu, wobei weiterhin eine klare Überlagerung der Strukturen stattfand (Abb. 43).

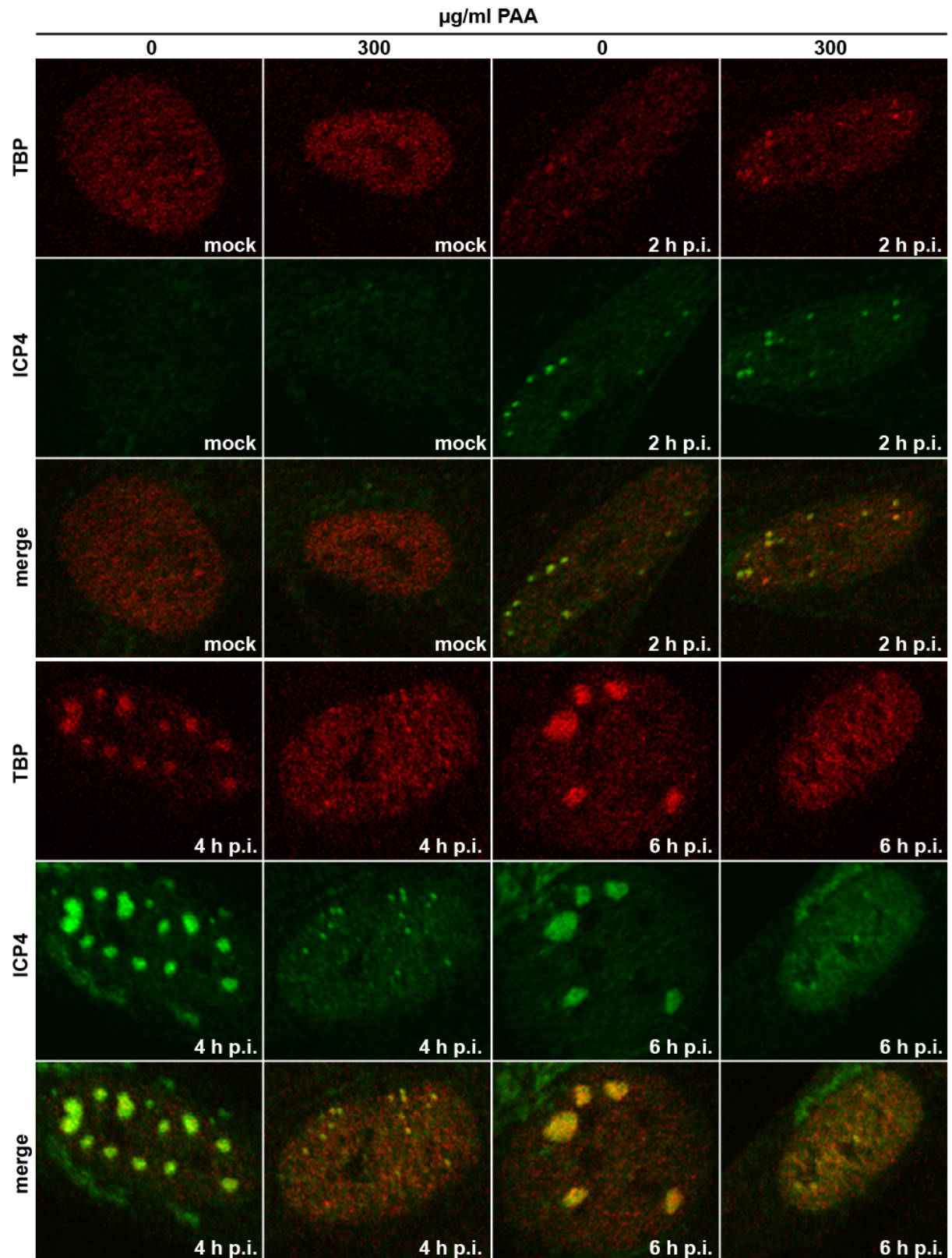


Abb. 43: Kolokalisierung von TBP und ICP4 im HSV-1-Infektionsverlauf

Mock-infizierte oder HSV-1-infizierte HFF2-Zellen wurden 1 h p.i. ohne oder mit 300 µg/ml PAA behandelt und 2, 4 und 6 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von ICP4 wurden die Zellen mit polyclonalem anti-ICP4 Kaninchenserum und zum Nachweis von TBP mit monoklonalem TBP-Antikörper (3G3) (Maus) inkubiert. ICP4 wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und TBP mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der konfokalen Signale einer Zelle ist für jeden Zeitwert dargestellt (merge). Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an.

Somit stellte sich die Frage, ob die Bildung der Replikationszentren eine Voraussetzung für die Umstrukturierung der TBP-Lokalisierung darstellt. In PAA-behandelten HFFF2-Zellen waren TBP- und ICP4-Kernstrukturen ab 2 h p.i. zu beobachten, die nicht von den Strukturen in unbehandelten Zellen zu unterscheiden waren. Zu den späteren Infektionszeitpunkten 4 und 6 h p.i. hingegen führte die PAA-Behandlung zu einem Verlust sowohl der vergrößerten Replikationszentren als auch der größer werdenden TBP-Kerndomänen (Abb. 43).

Daraus lässt sich schließen, dass die Kolokalisierung von ICP4 und TBP in nukleären Domänen dem Beginn der nachweisbaren viralen DNA-Synthese vorausgeht. Dies wiederum legt nahe, dass die initiale TBP-Relokalisierung mit der ICP4-Lokalisierung in Präreplikationszentren einhergeht, und unabhängig von der viralen DNA-Replikation ist. Dagegen scheint die Größenzunahme der Replikationszentren eine Voraussetzung für die Ausbildung der vergrößerten TBP-Kerndomänen zu sein.

6.5. Kolokalisierung von hsTAF1 mit ICP4 in HSV-1-infizierten HFFF-2-Zellen

TAF1 ist ein hoch konserviertes, multifunktionelles Protein, das durch die Vermittlung der Promotorerkennung und durch Katalyse von kovalenten Modifikationen des Chromatins und anderer Faktoren zur Genregulation beiträgt (Wassarman und Sauer, 2001; Gangloff et al., 2001). Innerhalb des TFIID-Komplexes ähnelt TAF1 einem Gerüst, an das sich TBP und andere TAFs anlagern können. Es gibt Hinweise, dass die Interaktion von TBP und hsTAF1 *in vivo* für die aktive Transkription in Säugerzellen erforderlich ist (Martel et al., 2002).

Um Hinweise zur Funktion von hsTAF1 während der HSV-1-Infektion zu erlangen, wurde zunächst die Lokalisierung von hsTAF1 untersucht. Dabei zeigten sich in Kolokalisierungsstudien mit ICP4 Relokalisierungen von hsTAF1 (Abb. 44), die vergleichbar mit den Umstrukturierungen von TBP (Ergebnisteil 6.4.2.) waren. In mock-infizierten HFFF2-Zellen war ein diffuses hsTAF1-Färbemuster zu beobachten, das sich ab 2 h p.i. veränderte, indem sich frühe punktierte Kernstrukturen bildeten. 4 und 6 h p.i. kam es zu einer Größenzunahme der hsTAF1-Kerndomänen, die während der gesamten Infektion mit HSV-1 ICP4 kolokalisierten (Abb. 44).

Dies unterstützt die Annahme, dass TBP und hsTAF1 in gemeinsamen Strukturen mit der viralen DNA-Replikation und mit Stellen viraler Transkription zu finden sind.

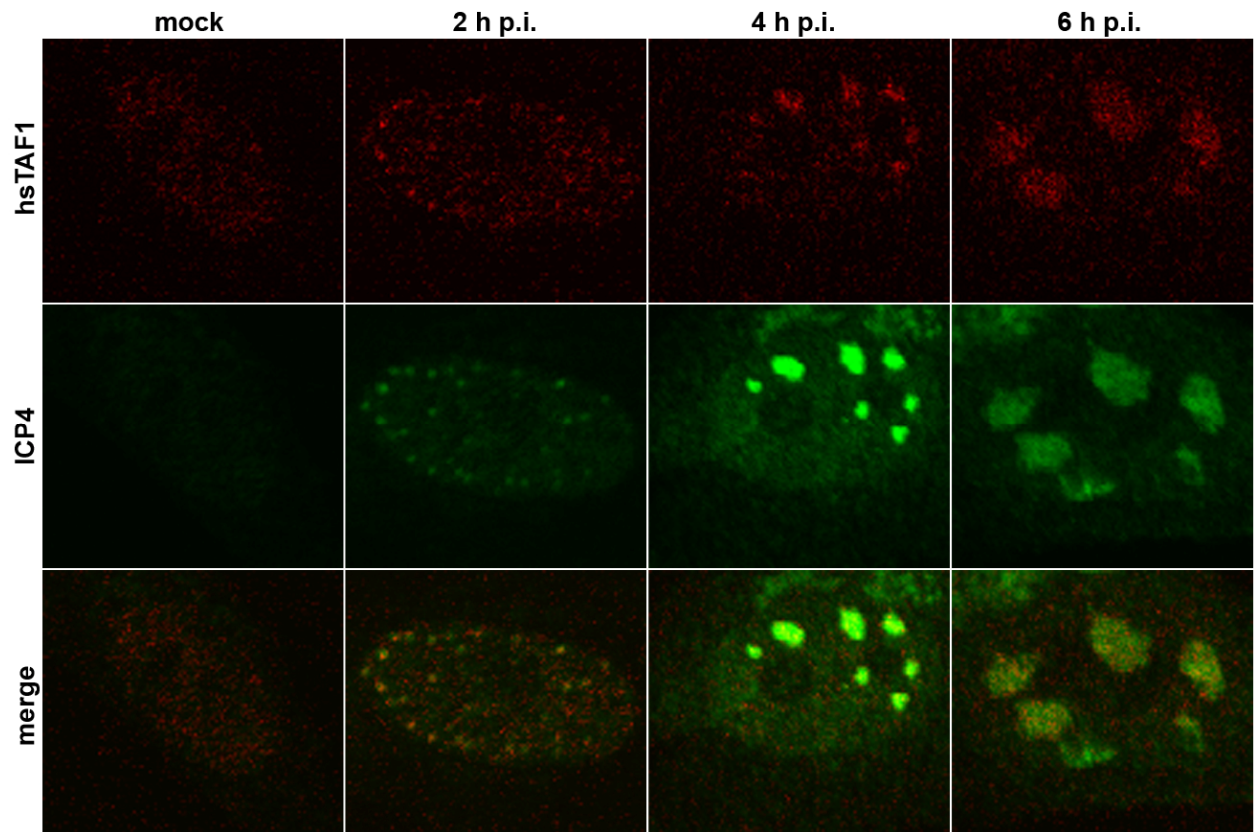


Abb. 44: Kolokalisierung von hsTAF1 und ICP4 während der HSV-1-Infektion

HFFF2-Zellen wurden mit HSV-1 infiziert oder mock-infiziert und 2, 4 und 6 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Der Nachweis von ICP4 erfolgte mit polyklonalem anti-ICP4 Kaninchenserum und der von hsTAF1 mit monoklonalem hsTAF1-Antikörper (sc-735) (Maus). Dabei wurde ICP4 mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und hsTAF1 mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Die Überlagerung der konfokalen Mikroskopaufnahmen einer Zelle ist dargestellt (merge).

6.6. Kolokalisierungsstudien über hsTAF4 im HSV-1-Infektionsverlauf

Die gemeinsame Rekrutierung von hsTAF1 und TBP in Kernbereiche der viralen DNA-Synthese legt nahe, dass weitere TFIID-Komponenten im HSV-1-Infektionsverlauf relokalisiert werden könnten. Zur Untersuchung dieser These wurden Lokalisierungsstudien über hsTAF4 durchgeführt. Es wurde beschrieben, dass hsTAF4 als spezifischer transkriptioneller Koaktivator fungieren kann (Mengus et al., 1997). Die hsTAF4-Kontakte zu Aktivatoren können dabei entweder den Präinitiationskomplex der Transkription stabilisieren oder essentielle strukturelle Veränderungen in ihm induzieren.

Während der HSV-1-Infektion in HFFF2-Zellen konnte auch für hsTAF4 eine Relokalisierung der granulären Kernlokalisierung in mock-infizierten Zellen zu einer Ausbildung von nukleären Domänen nachgewiesen werden (Abb. 45). Sobald ICP4-Kernstrukturen 2 h p.i. sichtbar wurden, kolokalisiert die hsTAF4-Strukturen mit ICP4. Die

Kerndomänen vergrößerten sich simultan von 4 bis 6 h p.i., wie bereits für hsTAF1 und TBP beschrieben wurde (Abb. 45).

Anhand der hsTAF4-Lokalisierung sollte beispielhaft analysiert werden, ob die initiale Rekrutierung von TAFs in ICP4-Kernstrukturen vergleichbar zu der von TBP war. Nach der Behandlung der HFFF2-Zellen 1 h p.i. mit 300 µg/ml PAA waren ebenfalls frühe punktierte hsTAF4-Kernstrukturen 2 h p.i. sichtbar, aber es konnte keine Vergrößerung dieser nukleären Strukturen im HSV-1-Infektionsverlauf beobachtet werden (Abb. 45).

Diese Ergebnisse zeigen die simultane Relokalisierung von TBP, hsTAF1 und hsTAF4 an Stellen der HSV-1 DNA-Replikation und liefern erste Hinweise für eine gemeinsame Rolle in der viralen Transkription. Interessanterweise erfolgt die Relokalisierung vor der nachweisbaren viralen DNA-Replikation, wohingegen die Entstehung der vergrößerten Kerndomänen der Transkriptionsfaktoren von der Ausprägung viraler DNA-Replikationszentren abhängig ist.

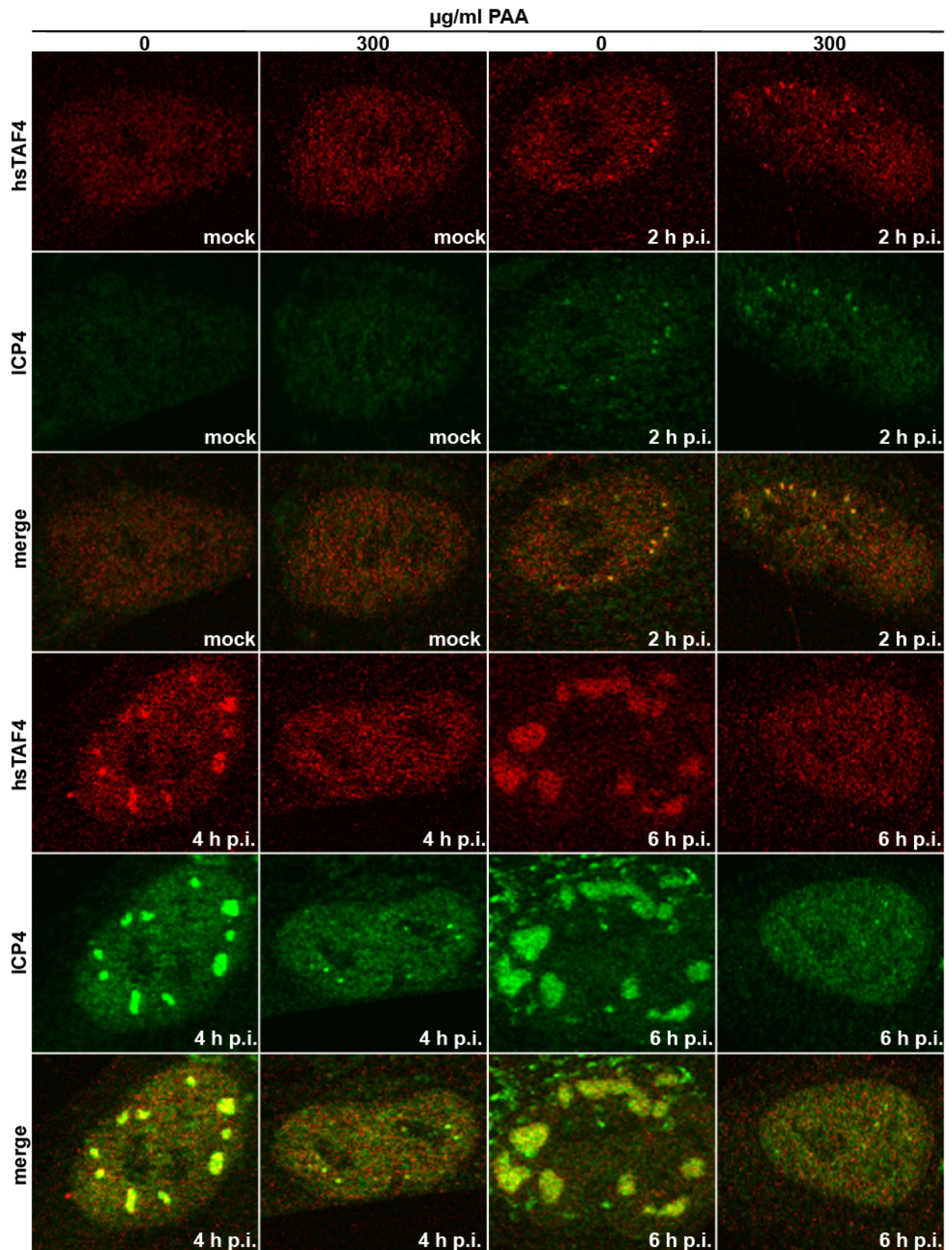


Abb. 45: Kolokalisierung von hsTAF4 und ICP4 im HSV-1-Infektionsverlauf

Mock-infizierte oder HSV-1-infizierte HFF2-Zellen wurden 1 h p.i. ohne oder mit 300 µg/ml PAA behandelt und 2, 4 und 6 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von ICP4 wurden die Zellen mit polyklonalem anti-ICP4 Kaninchenserum und zum Nachweis von hsTAF4 mit monoklonalem hsTAF4-Antikörper (32TA) (Maus) inkubiert. ICP4 wurde mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (grün) und hsTAF4 mit Alexa Fluor 555-konjugiertem anti-Maus IgG (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der konfokalen Signale einer Zelle ist für jeden Zeitwert dargestellt (merge).

V. Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Studien über die Expression und Lokalisierung von TFIID-Untereinheiten während der Infektion durch das Baculovirus AcMNPV durchgeführt. Anschließend wurden mittels RNA-Interferenz funktionelle Analysen für TBP und die baculoviralen Transkriptions- und Replikationsfaktoren IE2, DBP und LEF-4 angefertigt. Durch vergleichende Studien über HSV-1-Infektionen konnten Hinweise zum generellen Regulationsmechanismus basaler Transkriptionsfaktoren im Infektionsverlauf großer DNA-Viren gewonnen werden.

1. Die TBP-Proteinmenge steigt im AcMNPV-Infektionszyklus an

Die Erforschung der Steuerung des basalen Transkriptionsfaktors TBP ist von großer Bedeutung für das Verständnis der zellulären und viralen Genexpression. Bis heute ist wenig bekannt über die Regulation der Proteinmenge und die Stabilität von TBP. Untersuchungen zur TBP-Expression und -Lokalisierung im Verlauf der Baculovirusinfektion sollten neue Erkenntnisse über die Bedeutung von TBP für den viralen Infektionsverlauf liefern.

Zur Untersuchung der Rolle von TBP an der Transkription der späten und sehr späten baculoviralen Faktoren wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Expression von TBP während des Infektionsverlaufs untersucht. Die Expressionsanalysen für TBP zeigten in den beiden permissiven Zelllinien Sf21 und TN-368 für die AcMNPV-Infektion, dass die TBP-Proteinmenge in der späten Phase der Infektion um das Vierfache gesteigert wird. Dies stellt ein ungewöhnliches Ergebnis dar, da die Synthese anderer zellulärer Faktoren während des viralen Infektionsverlaufes stark reduziert wird (Carstens et al., 1979; Wood, 1980). Beispiele hierfür sind das Protein Aktin, die Histone H2A, H3 und H4 und das Hitzeschock-Protein 70, deren Transkription in der späten Phase der Infektion abnimmt (Ooi und Miller, 1988).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Zunahme der TBP-Expression in der späten baculoviralen Infektionsphase wurde in vorhergehenden Western Blot-Studien nicht festgestellt (Rasmussen und Rohrmann, 1994). In diesen Studien war die TBP-Expression in AcMNPV-infizierten Sf9-Zellen bis 72 h p.i. konstant und zu späteren Infektionszeitpunkten wurde keine TBP-Bande mehr beobachtet. In diesen Experimenten wurde der gegen *Drosophila*-TBP gerichtete monoklonale Antikörper 58C9 verwendet. Da das Sf-TBP-Protein ein berechnetes Molekulargewicht von 34 kDa besitzt, die nachgewiesenen Proteine aber bei

36 und 38 kDa zu finden waren, wurde argumentiert, dass es sich eventuell um posttranslationale Modifikationen handeln könnte (Rasmussen und Rohrmann, 1994). Experimente, die von Krappa et al. (1995) durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls keinen Anstieg der TBP-Proteinmenge und eine Abnahme von TBP nach 24 h p.i. in AcMNPV-infizierten Sf21-Zellen unter Verwendung des Antikörpers 58C9. In diesen Studien war nur ein einzelnes konstantes Signal eines ca. 33 kDa großen Polypeptids bis 24 h p.i. zu detektieren und später nicht mehr zu beobachten.

In den Western Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Antikörper 58C9 und mit dem gegen Sf-TBP gerichteten polyklonalen Antiserum SA3890 ebenfalls nur eine Einzelbande mit dem für TBP vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 34 kDa festgestellt, die allerdings in der späten Infektionsphase an Intensität deutlich zunahm. Die TBP-Analysen von Krappa et al. (1995) erfolgten in salzlöslichen Kernfraktionen, bei denen nur die löslichen Proteine des Kerns, aber keine mit Membranen assoziierten Proteine präpariert werden. Bei der in den vorliegenden Studien eingesetzten Detergenzmethode werden dagegen auch an Membranen gebundene Proteine präpariert. Da TBP in der späten Infektionsphase in virale Replikationszentren relokalisiert wird und damit an die Kernmatrix gebunden sein könnte, kann dies als mögliche Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten angesehen werden.

Bis heute sind nur wenige Studien zur transkriptionellen Regulation der TBP-Expression durchgeführt worden (Harland et al., 2002). Von Rasmussen und Rohrmann wurde 1994 beschrieben, dass die Transkription von TBP bis 24 h p.i. auf einem konstanten Niveau in Northern Blot-Studien nachzuweisen war. Im späteren Infektionsverlauf war keine Transkription mehr festzustellen. Da TBP-Proteinsignale bis 72 h p.i. zu beobachten waren, wurde argumentiert, dass TBP ein langlebiges Protein sein könnte. Diese Ergebnisse konnten prinzipiell in der vorliegenden Arbeit durch Northern Blot-Analysen bestätigt werden, die ein gleich bleibendes Niveau des TBP-Transkripts bis 24 h p.i. zeigten, gefolgt von einer abnehmenden, aber bis 72 h p.i. nachweisbaren Menge des TBP-Transkripts.

Zur Untersuchung der TBP-Stabilität wurden Studien mit dem Translationsinhibitor CHX durchgeführt. Uninfizierte Sf21-Zellen zeigten drei bis vier Tage nach CHX-Behandlung keine Reduktion der TBP-Proteinmenge, wodurch Hinweise auf eine große Stabilität von TBP erhalten wurden. In TN-368-Zellen folgte auf die Zunahme der TBP-Proteinmenge in der späten Phase der Infektion eine Abnahme der TBP-Menge nach 24 h p.i.. Diese Abnahme von TBP in der sehr späten Infektionsphase könnte auf einer geringeren Stabilität des Proteins in TN-368-Zellen beruhen. In Untersuchungen mit CHX-behandelten AcMNPV-infizierten

TN-368-Zellen war dagegen eine deutliche Stabilisierung von TBP bis in die sehr späte Infektionsphase zu beobachten. Dieser verzögerte Abbau in der sehr späten Phase der Infektion unter dem Einfluss von CHX war ebenfalls für das sehr früh exprimierte virale IE2-Protein festzustellen. Diese Beobachtung wird gestützt durch frühere Studien, bei denen IE2 unter CHX-Einfluss ebenfalls stabilisiert wurde, weswegen über einen aktiven Abbaumechanismus für das IE2-Protein in der späten viralen Infektionsphase spekuliert wurde (Krappa et al., 1995; Ross und Guarino, 1997). Somit ist es wahrscheinlich, dass TBP in TN-368-Zellen in der sehr späten Phase der Infektion, ähnlich wie IE2, in Abhängigkeit von neusynthetisierten Proteinen, und somit aktiv, abgebaut wird.

Des Weiteren wurde in diesen Studien ersichtlich, dass die virusinduzierte TBP-Zunahme bis 24 h p.i. in TN-368-Zellen von der Translation abhängig ist. Dies legt den Schluss nahe, dass eine verstärkte Translation während der Baculovirusinfektion am TBP-Proteinanstieg beteiligt ist. Der Anstieg von TBP in der späten Phase der Infektion in TN-368-Zellen sowie in der späten und sehr späten Infektionsphase in Sf21-Zellen könnte damit einerseits auf einer verstärkten Translation der TBP-Transkripte und andererseits auf der Regulation eines aktiven TBP-Abbaumechanismus beruhen.

Frühere Ergebnisse aus quantitativen Studien in Hefezellen zeigen, dass 30000 bis 50000 TBP-Moleküle pro Hefezelle nachgewiesen werden können. Durch diese TBP-Menge kann theoretisch eine gleichzeitige TBP-Aktivität an allen Promotoren des Hefe-Genoms erfolgen (Lee und Young, 1998). TBP wird nach der Translation durch ein Mitglied der Karyopherin (Kap)-Importin-Proteinfamilie durch die Kernporenkomplexe in den Zellkern transportiert, woraufhin es in Anwesenheit von TBP-spezifischen TATA-Box-DNA-Sequenzen von seinem Transporterprotein dissoziiert (Pemberton et al., 1999).

Durch die replizierenden viralen Genome nimmt die Zahl potentieller TBP-Bindestellen in den Insektenzellen zu, wodurch unter der Voraussetzung einer Einbeziehung von TBP in die virale Transkription eine größere TBP-Proteinmenge erforderlich werden könnte. Da die TBP-Menge in der späten Infektionsphase deutlich ansteigt, ist es denkbar, dass TBP zusammen mit der viruskodierten RNA-Polymerase an der Transkription später und sehr später viraler Gene beteiligt ist. Unterstützung findet diese Vermutung in Studien, die zeigen, dass eine Überexpression von TFIID/TBP in *Drosophila*-Zellen zu einer erhöhten Transkription von TATA-Box-enthaltenden Promotoren führt (Colgan und Manley, 1992).

Eine mögliche Erklärung für den starken Anstieg der TBP-Expression ist, dass TBP eine wichtige Rolle bei der Hyperexpression der sehr späten viralen Gene polyhedrin und p10 spielt. Ihre Promotoren enthalten TATA-Box-ähnliche Sequenzen, die nicht essentiell für die

Expression der Gene sind (Possee und Howard, 1987; Weyer und Possee, 1989). Durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren könnte TBP jedoch indirekt an diese Promotoren binden. Dadurch könnte TBP eine wichtige Funktion bei der Transkription der späten und der hyperexprimierten sehr späten viralen Gene durch die viruskodierte RNA-Polymerase besitzen.

2. TBP lokalisiert im baculoviralen Infektionsverlauf in viralen Replikationszentren

Die Untersuchung, ob während der baculoviralen Infektion neben dem Anstieg der TBP-Proteinmenge auch eine Veränderung der subzellulären TBP-Lokalisierung zu verzeichnen ist, ergab eine Relokalisierung von TBP innerhalb des Zellkerns in AcMNPV-infizierten Zellen. Bis in die frühe Infektionsphase war TBP in einem granulären Färbemuster nachweisbar. Ab 4 h p.i. war in den ersten Zellen eine TBP-Relokalisierung in distinkte Kerndomänen zu beobachten, die während des Infektionsverlaufs an Größe zunahmen bis ab 16 h p.i. eine einzelne große Kernstruktur sichtbar wurde. Somit erfolgte mit der Zunahme der TBP-Proteinmenge auch eine TBP-Relokalisierung.

TBP kolokalisierte dabei mit BrdU-markierten Orten der viralen DNA-Synthese. Die viralen Replikationszentren stellen eine Ansammlung von Replikationsfaktoren, weiteren viralen und zellulären Komponenten, sowie neusynthetisierter viraler DNA dar (Übersichtsartikel Maul, 1998; Übersichtsartikel Wilkinson und Weller, 2003).

Inhibitorstudien, bei denen die virale Replikation entweder direkt mittels Aphidicolin oder durch die Hemmung der Proteinneusynthese durch CHX inhibiert wurde, zeigten die Abhängigkeit der TBP-Umstrukturierung von der Bildung viraler DNA-Replikationszentren.

Lokalisierungsstudien mit den AcMNPV-Proteinen LEF-3 und DBP haben gezeigt, dass diese ebenfalls in viralen Replikationszentren lokalisieren (Mainz et al., 2002). In der späten Infektionsphase konnte für DBP festgestellt werden, dass es in einer vergleichbaren Struktur wie TBP vorliegt (Quadt, 2000). Sowohl für LEF-3 als auch für DBP sind DNA-bindende Eigenschaften beschrieben worden (Hang et al., 1995; Mikhailov et al., 1998). LEF-3 gilt als essentieller Faktor für die virale DNA-Replikation, wohingegen für DBP bisher nur angenommen wird, dass es an der Replikation des viralen Genoms beteiligt ist (Kool et al., 1994; Okano et al., 1999).

Der Mechanismus der TBP-Zunahme und der TBP-Rekrutierung zu Orten replizierender Virus-DNA läuft in einem zellulären Umfeld ab, dessen Funktionen zu einem großen Teil abgeschaltet sind (Carstens et al., 1979; Wood, 1980; Ooi und Miller, 1988). Andererseits ist unter diesen Bedingungen eine sehr effiziente virale Transkription möglich. Dies bedeutet, dass das Virus einen physiologischen Prozess der TBP-Rekrutierung verstärkt, der vermutlich für das Virus von funktioneller Bedeutung ist.

TBP und die zelluläre RNAP II kolokalisierten in nukleären Domänen in uninfizierten Zellen und bis 8 h p.i. in AcMNPV-infizierten Zellen. Frühere Studien berichten, dass die zelluläre RNAP II nur an der frühen Transkription baculoviraler Faktoren beteiligt ist (Grula et al., 1981; Fuchs et al., 1983; Huh und Weaver, 1990). Die hier beobachtete diffuse Kernlokalisierung der RNAP II in der sehr späten Infektionsphase deutet auf einen Übergang zur Transkription durch die virusinduzierte RNA-Polymerase hin. Somit geben diese Ergebnisse indirekte Hinweise darauf, dass TBP und die RNAP II an der frühen viralen Transkription beteiligt sind.

Des Weiteren konnten Beobachtungen (Durantel et al., 1998) bestätigt werden, dass LEF-4 als Komponente der viruskodierten RNA-Polymerase ab der späten Infektionsphase exprimiert wird. Somit könnte LEF-4 zumindest bis 24 h p.i. zusammen mit TBP an der Transkription später und initial auch sehr später viraler Faktoren in TN-368-Zellen beteiligt sein. Da TBP in Sf21-Zellen über 24 h p.i. hinaus nachweisbar ist, könnte TBP in dieser Zelllinie auch noch eine stärkere Rolle in der sehr späten viralen Genexpression übernehmen. Aufgrund der schneller verlaufenden AcMNPV-Infektion in TN-368-Zellen ist es auch möglich, dass die Transkription sehr später viraler Gene in TN-368-Zellen 24 h p.i. bereits abgeschlossen ist.

Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass die virale Transkription und die virale DNA-Synthese in den gleichen Kernstrukturen stattfinden. Die Kolokalisierung von TBP legt dessen Beteiligung an der viralen Transkription nahe. Insgesamt ist es ebenfalls denkbar, dass TBP eine Rolle in der Regulation der viralen DNA-Replikation spielt, wie es für die Replikation der DNA von humanen Papillomviren beschrieben wurde (Hartley und Alexander, 2002).

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse ist eine funktionelle Kopplung der TBP-Relokalisierung mit der viralen DNA-Replikation und der viralen Transkription anzunehmen.

3. Protein-Ubiquitinierungen während der Baculovirusinfektion

Die Expressionsstudien unter Verwendung des Translationsinhibitors CHX deuten darauf hin, dass TBP sowohl in Sf21- als auch in TN-368-Zellen eine Stabilität von mindestens 72 Stunden hat. Im Gegensatz zu Sf21-Zellen ist TBP in TN-368-Zellen in der sehr späten Infektionsphase nicht mehr nachweisbar, was darauf hinweist, dass in TN-368-Zellen das TBP-Protein, ebenso wie das sehr früh exprimierte virale IE2-Protein, durch einen aktiven Abbaumechanismus reduziert werden. Sowohl in Insekten- als auch in Säugerzellen weiß man über die Stabilität von TBP und dessen Abbau bisher nur wenig. Es wird angenommen, dass die Dimerisierung von TBP-Molekülen einen Schutzmechanismus vor der Degradation des Proteins oder eine Autorepression der DNA-bindenden Eigenschaften darstellen könnte (Coleman et al., 1995; Geisberg und Struhl, 2000).

Die Stabilität eines Proteins kann von seiner N-terminalen Aminosäure abhängen. Die „N-Ende-Regel“ beschreibt den Zusammenhang zwischen der ersten Aminosäure einer Polypeptidkette und deren Halbwertszeit. Die Aminosäuren Arginin oder Leucin wirken beispielsweise destabilisierend, während die Aminosäuren Methionin oder Valin schützende Eigenschaften für Proteine besitzen (Übersichtsartikel Varshavsky, 1996). Die Rolle der N-terminalen Aminosäure oder eine mögliche Modifizierung der N-terminalen Domäne von TBP für die Stabilität des TBP-Proteins ist bislang unbekannt.

Im Infektionszyklus vieler Viren spielt Ubiquitin eine wichtige Rolle. Adenoviren und Papillomviren üben einen regulierenden Einfluss auf die Aktivität der zellulären Ubiquitin-E3-Ligase aus (Scheffner et al., 1993; Querido et al., 2001). Frühere Arbeiten über virale Proteine beschreiben, dass das HSV-1-Protein ICP0, wie andere Proteine der „RING“-Finger-Proteinfamilie, als E3-Ligase fungiert und mit konjugiertem Ubiquitin in Lokalisierungsstudien kolokalisiert (Everett, 2000).

Für den Degradationsmechanismus der zellulären RNA-Polymerase II konnten Ubiquitinierungen und der proteasomale Abbau nachgewiesen werden (Lee et al., 2002). In embryonalen Mäusekarzinomzellen (F9-Zellen) ist beschrieben worden, dass TBP möglicherweise durch spezifische Proteolyse in Proteasomen inaktiviert wird, wobei die Differenzierung von F9-Zellen auf der selektiven Proteolyse von TBP und TAF4 beruhen könnte (Perletti et al., 2001).

Zur Untersuchung der Frage, ob der Ubiquitin-Proteasomen-Weg an der Reduktion der zuvor gesteigerten TBP-Proteinmenge in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen beteiligt sein könnte, wurden Kolokalisierungsstudien mit konjugiertem Ubiquitin durchgeführt.

In Vergleichsstudien über die Kolokalisierung von konjugiertem Ubiquitin mit dem frühen viralen IE2-Protein konnte zum ersten Mal eine Assoziation von IE2-Domänen mit konjugiertem Ubiquitin in der frühen baculoviralen Infektionsphase demonstriert werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der postulierten Funktion des „RING“-Finger-Proteins IE2 des BmNPV als E3-Ligase und kann somit als immunhistochemische Bestätigung für die publizierten *in vitro*-Studien (Imai et al., 2003) betrachtet werden. Des Weiteren bestätigt es Beobachtungen, bei denen BmNPV IE2 in der frühen Infektionsphase unter dem Einfluss des Proteasomeninhibitors MG132 oder nach Mutation seiner E3-Ligase-Domäne und damit vermutlich dem Verlust seiner Auto-Ubiquitinierungsaktivität, verstärkt in Kerndomänen akkumuliert (Imai et al., 2005).

Darüber hinaus konnte eine Assoziation von TBP und damit von viralen Replikationszentren mit konjugiertem Ubiquitin und mit akkumulierenden IE2-Kernsignalen zu den frühen Zeitpunkten der baculoviralen Infektion aufgezeigt werden. Es war jedoch keine Kolokalisierung von TBP mit konjugiertem Ubiquitin oder IE2 in der sehr späten Infektionsphase in TN-368-Zellen nachweisbar. Dies korreliert mit publizierten Daten zur Assoziation von IE2 mit Orten der aktiven viralen Replikation (Mainz et al., 2002).

Die TBP-Strukturen wiesen ein granuläres Färbemuster auf, wohingegen IE2 und Ubiquitin in punktierten nukleären Strukturen sichtbar wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Assoziation von Ubiquitin mit TBP-Strukturen auf die Kolokalisierung von IE2 und konjugiertem Ubiquitin in gemeinsamen punktierten Kerndomänen innerhalb von viralen Replikationszentren zurückzuführen ist. Anhand dieser Kolokalisierungsstudien ergab sich somit keine Evidenz für ubiquitiniertes TBP.

Für das baculovirale Ubiquitin wurde gezeigt, dass es die Polyubiquitinierung von Proteinen als Kettenterminator verhindern und somit den Protein-Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System unterbinden könnte (Haas et al., 1996).

Infektionsstudien mit den AcMNPV-Mutanten v-ubi FS und v-ubi RGG zeigten, dass kein Einfluss auf die Verteilung von konjugiertem Ubiquitin und die IE2-Lokalisierung in der frühen Phase der Infektion festzustellen war. Hingegen scheint das viruskodierte Ubiquitin eine Rolle bei der Entstehung der fadenförmigen IE2-Strukturen in der späten baculoviralen Infektionsphase zu spielen. Falls es sich bei den fadenförmigen IE2-Strukturen tatsächlich um eine Akkumulation von IE2-Abbauprodukten handelt, könnte das virale Ubiquitin somit eine Rolle beim IE2-Abbau spielen.

Vorhergehende Expressionsstudien ergaben nach Infektionen mit den v-ubi AcMNPV-Mutanten keine Hinweise auf eine TBP-Stabilitätsänderung (Voß, 2003; Günther, 2005).

Daher wurden keine weiterführenden Lokalisierungsstudien mit Hilfe der v-ubi AcMNPV-Mutanten für TBP vorgenommen. Ein Einfluss des viralen Ubiquitins auf die TBP-Lokalisierung kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, und könnte in folgenden Lokalisierungsstudien unter Verwendung der v-ubi AcMNPV-Mutanten überprüft werden.

Neben der Ubiquitinierung können Proteine auch durch die Anlagerung von SUMO-1 („small ubiquitin-related modifier 1“) an Lysinreste des Substrates modifiziert werden. SUMO-1 ist ein ubiquitinverwandtes Protein, durch dessen Bindung Proteine jedoch nicht für den Abbau durch das Proteasom markiert werden (Übersichtsartikel Saitoh et al., 1997; Übersichtsartikel Hodges et al., 1998; Jentsch und Pyrowolakis, 2000). SUMO kann Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen und als Antagonist von Ubiquitin fungieren (Übersichtsartikel Verger et al., 2003), wobei die SUMOylierung einen Block der Ubiquitinierung von Proteinen darstellen könnte, wodurch die Degradation des Substrates verhindert werden könnte (Desterro et al., 1998).

Bisher ist eine SUMO-1-Bindung an TBP und eine daraus resultierende Stabilisierung des Proteins nicht beschrieben worden. Initiale Western Blot-Analysen dieser Arbeit erbrachten ebenfalls keinen Hinweis auf eine solche TBP-Modifikation (Daten nicht gezeigt).

In früheren Arbeiten ist beschrieben worden, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht-ubiquitinierte Proteine ebenfalls durch das Proteasom erkannt und eliminiert werden können (Bercovich et al., 1989; Sheaff et al., 2000; Kalejta und Shenk, 2003). Eine proteasomale Degradation von TBP während der sehr späten Virusinfektion in TN-368-Zellen kann somit durch die erfolgten Studien nicht ausgeschlossen werden.

Eine Kontrolle der TBP-Proteinmenge ist ebenfalls durch Interaktionen von TBP mit zellulären oder viralen Faktoren, die seine Stabilität oder den Modifizierungsgrad beeinflussen, denkbar. Bei Untersuchungen in Hefezellen ist die Molekülzahl der TBP-assoziierten Faktoren bestimmt worden, welche um den Faktor 10 niedriger war als die von TBP (Lee und Young, 1998). Somit hängen die Aktivität und möglicherweise auch die Stabilität von TBP von der Regulation der TAFs als limitierende Proteine ab.

4. Inhibitionsstudien über TBP und die AcMNPV-Faktoren IE2, DBP und LEF-4

Zur Erforschung der Funktion von Genen können genetische Mutanten in Form von „knock out“-Zellen, -Organismen oder -Viren, zumeist in aufwendigen Verfahren, hergestellt werden. Als Alternative zum Ausschalten von Genen eignet sich der Einsatz von RNA-Molekülen, wobei die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) durch das Einbringen von dsRNA mindestens zehnmal so effektiv ist wie die Verwendung von einzelsträngigen RNAs (Fire et al., 1998).

Mit Hilfe von RNAi ist es nicht nur möglich zelluläre mRNAs zu degradieren. In einer Vielzahl von Studien ist es ebenfalls gelungen die Synthese viraler Faktoren zu unterdrücken, wie z.B. für die essentiellen regulatorischen HIV-1-Proteine Tat und Rev oder für Faktoren des Denguevirus und des Semliki-Forest-Virus gezeigt werden konnte (Caplen et al., 2002; Coburn und Cullen, 2002; Übersichtsartikel Dykxhoorn et al., 2003). Durch RNAi-Studien während der Baculovirusinfektion ist es gelungen die Expression von IE1 und GP64 bzw. des anti-apoptotischen Proteins IAP3 zu inhibieren (Means et al., 2003; Valdes et al., 2003).

Zur funktionellen Analyse der Bedeutung des TBP-Anstiegs in der späten Phase der Baculovirusinfektion sollte die TBP-Expression unterdrückt werden. Dabei musste im Vorfeld der Studien mit verschiedenen möglichen Problemen gerechnet werden. Aufgrund der möglicherweise essentiellen Rolle von TBP für die zelluläre Transkription, war es einerseits denkbar, dass die Reduktion von TBP für die Zellen letal sein könnte, wodurch weiterführende Untersuchungen der Virusinfektion unmöglich werden würden. Andererseits war aufgrund der zuvor beobachteten Stabilität des TBP-Proteins unklar, ob eine Reduktion der TBP-mRNA eine Wirkung auf die TBP-Proteinmenge in den Versuchsansätzen zeigen würde. Eine weitere Schwierigkeit bei der Untersuchung von Faktoren durch die RNA-Interferenz ist, dass nicht alle Zellen mit der dsRNA transfiziert werden können. Dadurch kann der RNAi-Effekt durch die nicht-transfizierten Zellen überlagert werden.

Gemeinhin wird angenommen, dass TBP ein essentieller Faktor für die Transkription ist. Demnach wäre davon auszugehen, dass die Transfektion von dsRNA TBP für die Zellen aufgrund der Blockierung der TBP-Synthese letal ist, wodurch eine Untersuchung im Infektionsverlauf kaum möglich sein sollte. Im Mausmodell konnte jedoch eine differentielle Abhängigkeit der RNA-Polymerasen von TBP aufgezeigt werden, wobei der Verlust von TBP die Transkription der RNAP I und RNAP III blockiert, die RNAP II hingegen in einem

transkriptionell aktiven Phosphorylierungszustand bleibt. Dies stellt einen TBP-unabhängigen transkriptionellen Mechanismus dar, der eine Reinitiation und Erhaltung der Genexpression durch die RNAP II *in vivo* erlaubt (Martianov et al., 2002).

Des Weiteren wurden in *in vitro*-Studien andere Multiproteinkomplexe wie TFTC („TBP-free TAFII-containing complex“) beschrieben, der verschiedene TAFs, aber nicht TBP enthält und eine TBP-freie RNAP II-Transkription vermittelt (Wieczorek et al., 1998). Dabei ist jedoch unklar, ob TFTC als funktionelle Einheit *in vivo* existiert. Andere TBP-freie und aus verschiedenen TAFs bestehende Proteinkomplexe sind als SAGA-Komplex in Hefe und als PCAF-Komplex in humanen Zellen beschrieben worden. Für beide TAF-Komplexe wird angenommen, dass sie die Genexpression durch Modifikationen der Chromatin-Struktur regulieren können und somit eine transkriptionelle Rolle außerhalb von TFIID spielen könnten (Grant et al., 1998; Ogryzko et al., 1998; Übersichtsartikel Albright und Tjian, 2000). In verschiedenen Organismen sind bisher drei TBP-ähnliche Proteine („TBP-like factor“, TLF oder „TBP-related factor“, TRF) beschrieben worden, die große Homologien zu TBP aufweisen (Übersichtsartikel Berk, 2000; Persengiev et al., 2003). TRF1 ist bisher nur in *Drosophila* identifiziert worden, wohingegen TRF2 in Metazoen weit verbreitet ist und TRF3 in Vertebraten exprimiert wird. Für diese Faktoren ist gezeigt worden oder wird angenommen, dass sie bei der Transkription durch die RNAP II eine Rolle spielen können (Übersichtsartikel Davidson, 2003; Chong et al., 2005).

Aufgrund solcher beschriebenen, teilweise redundanten zellulären Funktionen, kann somit angenommen werden, dass eine TBP-Reduktion nicht automatisch letal ist. Daher wurden RNAi-Studien zur Analyse der TBP-Expression in Insektenzellen durchgeführt.

Die TBP-Proteinmenge konnte unter den verwendeten Bedingungen in uninfizierten Sf21-Zellen ca. 64 bis 72 h p.t. reduziert werden. In der späten Infektionsphase, in der es zur starken TBP-Proteinzunahme während der AcMNPV-Infektion kommt, war jedoch keine deutliche Blockierung der TBP-Expression durch die transfizierten dsRNAs TBP möglich, wenn die Infektion 48 h p.t. erfolgte. Daher ist es nicht verwunderlich, dass weder auf die untersuchten viralen Proteinexpressionen noch auf die Entstehung von baculoviralen Einschlusskörpern ein Einfluss messbar war.

Der Grund der nur geringen Reduktionsmöglichkeiten von TBP könnte in der zuvor beschriebenen großen Stabilität des Proteins zu finden sein. Daher könnte in den experimentellen Ansätzen die TBP-Proteinmenge auch nach einer möglichen Degradation der TBP-mRNA durch dsRNA TBP weiterhin bestehen geblieben sein. Durch die RNAi wird darüber hinaus immer nur ein Teil der Zellen mit dsRNA transfiziert. Der RNAi-Effekt wird

daher von den untransfizierten Zellen überlagert. Durch die starke Zunahme von TBP in der späten baculoviralen Infektionsphase wird eine Reduktion der TBP-Proteinmenge in den transfizierten Zellen daher vermutlich nur schwer nachweisbar gewesen sein.

Anhand dieser Studien wurde deutlich, dass sich nicht eine mögliche Letalität der Zellen durch eine Reduktion von TBP als Problem für nachfolgende Infektionsstudien darstellte, sondern dass die Reduktion der Proteinmenge des zellulären Transkriptionsfaktors TBP zumindest im späten Infektionsverlauf durch RNAi-Studien kaum möglich war.

Um ausschließen zu können, dass die fehlende Reduktion von TBP auf experimentellen Problemen der RNAi-Technik im viralen Infektionsverlauf beruhte, wurde eine Etablierung der RNAi-Methode in Insektenzellen durch die Untersuchung von Reduktionen baculoviraler Faktoren durchgeführt. Dazu dienten RNAi-Studien über die viralen Faktoren IE2, DBP und LEF-4, für die entweder gezeigt ist oder vermutet wird, dass sie an der Transkription bzw. der Replikation der viralen DNA beteiligt sind (Kool et al., 1994; Okano et al., 1999). Anhand dieser Studien sollten darüber hinaus weitere Hinweise auf die Funktionen der untersuchten AcMNPV-Faktoren für den viralen Infektionsverlauf gewonnen werden.

In den zuvor beschriebenen Studien kolokalisierte das AcMNPV IE2-Protein in der frühen Infektionsphase mit TBP, was mit früheren Studien korreliert, in denen ein Teil der IE2-Domänen in viralen Replikationszentren zu finden war (Mainz et al., 2002). Die beschriebene Rolle von IE2 als E3-Ligase im Ubiquitin-Proteasomen-Weg und seine transaktivatorischen Eigenschaften machten es für RNAi-Studien interessant.

Mutationsstudien über IE2 mit AcMNPV-Mutanten zeigten, dass der Verlust von IE2 zu einer Verzögerung in der viralen Replikation, in der Expression der späten Gene und in der Produktion beider Virus-Phänotypen in Sf21-Zellen, jedoch nicht in der Zelllinie TN-5B1-4 führt (Prihod'ko et al., 1999). Die BV-Form der IE2-Mutanten bleibt bei der Injektion ins Hämocoel ähnlich infektiös wie die Wildtyp-Viren. Dagegen sind in den Einschlusskörpern der IE2-Mutanten weniger Virionen enthalten, wodurch ihre orale Infektiosität für Larven vermindert ist. Eine direkte Korrelation zwischen den mutanten Phänotypen und den Transaktivierungsfähigkeiten von IE2 gibt es nicht (Prihod'ko et al., 1999). In früheren Studien mit einer BmNPV IE2-Mutante ist eine Verzögerung der viralen DNA-Replikation gezeigt worden, obwohl die Wachstumsrate des Virus in BmN-4-Zellen nicht beeinflusst wird (Gomi et al., 1997).

Die in dieser Arbeit vorgestellten RNAi-Studien für das AcMNPV IE2-Protein zeigten eine deutliche Reduktion der IE2-Proteinmenge. Diese führte jedoch weder zu einem

Expressionsunterschied der anderen untersuchten frühen und späten viralen Faktoren, noch konnte ein Einfluss auf den TBP-Anstieg in der späten Infektionsphase oder auf die Virusproduktion festgestellt werden. Eine Verzögerung der BV-Produktion war anhand der Expressionsstudien über die viralen Strukturproteine P39 und GP64 genau so wenig auszumachen wie eine Minderung der Polyederbildung. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion von IE2 leichte Effekte auf die Virusproduktion hat, die aufgrund einer nicht vollständigen Blockierung der IE2-Proteinmenge schwer zu erkennen gewesen sein könnten.

Die vorliegenden Studien liefern einen weiteren Beleg, dass IE2 keine essentielle Rolle während der Baculovirusinfektion zu spielen scheint. Dies korreliert mit der Tatsache, dass es in den publizierten IE2-Mutanten-Studien möglich war, IE2-defiziente Viren zu isolieren (Gomi et al., 1997; Prikhod'ko et al., 1999).

Sowohl in Infektionsstudien mit AcMNPV als auch mit BmNPV ist beobachtet worden, dass das DBP-Protein an Orten der viralen DNA-Replikation lokalisiert (Okano et al., 1999; Mainz et al., 2002). Darüber hinaus ist für BmNPV DBP gezeigt worden, dass es vorzugsweise einzelsträngige DNA bindet und DNA-Doppelhelices *in vitro* entwinden kann (Mikhailov et al., 1998). Daher wird vermutet, dass DBP regulatorische Funktionen bei der Replikation des viralen Genoms ausüben könnte. Nach den TBP-Lokalisierungsstudien der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass DBP mit TBP zu den gleichen Infektionszeitpunkten in denselben Kerndomänen lokalisiert.

Nach dem Aufzeigen der Möglichkeit das virale IE2-Protein durch RNAi zu reduzieren, sollten Inhibitionsstudien über AcMNPV DBP als weiterer Vergleich zu den RNAi-Studien über TBP dienen. Neben der weiteren Etablierung der RNAi-Technik im baculoviralen Infektionssystem sollten dadurch Hinweise zur Funktion von DBP für den viralen Infektionsverlauf gewonnen werden.

Durch RNAi konnte die DBP-Expression in dieser Arbeit deutlich verringert werden. Dadurch wurde die IE2-Expression als Beispiel eines sehr frühen viralen Faktors nicht beeinträchtigt. Die Blockierung der DBP-Synthese führte dagegen zu einer signifikanten Steigerung der Proteinmengen der LEFs P35, LEF-3 und LEF-4 in der späten und sehr späten Infektionsphase. Diese induzierten LEF-Zunahmen hatten allerdings keine sichtbare Wirkung auf die Synthese viraler Strukturproteine oder auf die Bildung von viralen Einschlusskörpern. Die erhöhten LEF-Proteinmengen nach der Reduktion von DBP könnten auf einer verstärkten LEF-Proteinsynthese oder auf einer Stabilisierung bereits gebildeter LEFs beruhen. Da DBP

ein DNA-bindendes Protein ist (Mikhailov et al., 1998), ist es denkbar, dass es neben einer Funktion bei der viralen Replikation auch eine Rolle auf transkriptioneller Ebene spielt.

Dabei könnte DBP die DNA-Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren oder die Bindung von regulatorischen Proteinen an Promotorsequenzen der *lef*-Gene steuern. Andererseits könnte auch die Stabilität der LEFs durch DBP beeinflusst werden, indem es die Expression von LEF-stabilisierenden Proteinen inhibiert oder die Synthese von LEF-degradierenden Faktoren erhöht.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob die DNA-Bindung von DBP sequenzspezifisch erfolgt, und ob die Reduktion von DBP durch RNAi eine Steigerung der Synthese von LEF-Transkripten nach sich zieht.

Die durch die DBP-Reduktion induzierten LEFs besitzen unterschiedliche Funktionen. LEF-3 ist als ein essentieller viraler Faktor der baculoviralen Replikation beschrieben worden (Kool et al., 1994). Wie DBP bindet LEF-3 bevorzugt an einzelsträngige DNA, wobei es vermutlich an der Ausbildung von Replikationszentren beteiligt ist (Hang et al., 1995; Evans und Rohrmann, 1997; Ito et al., 2004). LEF-4 ist als eine von vier Untereinheiten der virus-kodierten RNA-Polymerase an der späten und sehr späten viralen Genexpression beteiligt. Dagegen spielt P35 zum einen eine entscheidende Rolle in der Apoptoseinhibition durch Hemmung von zellulären Caspasen (Hershberger et al., 1994; LaCount et al., 2000; Vier et al., 2000), und übt zum anderen eine Funktion bei der Blockierung der zellulären Proteinsynthese aus (Du und Thiem, 1997).

Generell könnte DBP im baculoviralen Infektionsverlauf eine Funktion als Negativ-Faktor für die Expression von LEF-Proteinen besitzen, wodurch die Effizienz der viralen DNA-Replikation und der späten viralen Genexpression gesteuert werden könnte.

In anderen Virussystemen ist gezeigt worden, dass virale Faktoren die Replikation des viralen Genoms und das Fortschreiten der Infektion regulieren können, und dadurch eine effizientere Bildung von Virus-Nachkommen erzeugen können. Solch eine Wirkung ist z.B. für das HIV-1-Protein Nef („negative factor“) beschrieben worden, das die Transkription und Replikation von HIV-1 reduzieren soll (Niederman et al., 1989). Neuere Studien zeigen hingegen widersprüchliche Wirkungen von HIV-1 Nef, weswegen angenommen wird, dass Nef die Infektion verstärkt und eine wichtige Rolle für die virale Replikation und Pathogenese spielt (Übersichtsartikel Joseph et al., 2005).

Aufgrund der Beobachtung, dass nach der DBP-Reduktion kein deutlicher Effekt auf die Bildung von baculoviralen Strukturproteinen oder die Bildung von Virus-Polyedern auszumachen war, scheint DBP keine essentielle Rolle im viralen Infektionsverlauf in der

Zellkultur zu spielen. Durch diese Studien konnte somit ein Aspekt zu den bislang wenig bekannten Funktionen von DBP hinzugefügt werden.

Ein weiterer viraler Faktor, an dem die RNAi-Bedingungen im viralen Infektionsverlauf ausgetestet wurden, war LEF-4. Die Untersuchung der Reduktion von LEF-4 war zudem interessant, da es als Komponente der viralen RNA-Polymerase die späte Baculovirustranskription steuert. Falls der TBP-Anstieg in der späten Infektionsphase eine Rolle bei der Transkription später bzw. sehr später viraler Faktoren spielt, könnte die Expressionsinhibition der viralen RNA-Polymeraseuntereinheit interessante Vergleichsmöglichkeiten zur Inhibition von TBP durch RNAi für den Einfluss auf die späte Virusinfektion bieten.

LEF-4 ist die am besten charakterisierte RNA-Polymerase-Untereinheit, für die gezeigt werden konnte, dass sie katalytische Funktionen in Form von Guanylyltransferaseaktivitäten für die Bildung von m⁷G-Kappen am 5'-Ende viraler mRNAs besitzt und zusätzlich RNA 5'-Triphosphatase- und ATPase-Aktivitäten aufweist (Guarino et al., 1998 b; Jin et al., 1998). Die Expressionsblockierung von LEF-4 zeigte weder einen deutlichen Einfluss auf die TBP-Expression noch auf die sehr frühe oder frühe Virusproteinbildung. Dagegen wurde durch die Reduktion von LEF-4 die Expression des ausschließlich spät exprimierten viralen Strukturproteins P39 und der sehr späten Faktoren P10 und Polyhedrin fast vollständig inhibiert.

Frühere Studien mit temperatursensitiven Mutanten zeigten, dass LEF-4 möglicherweise eine essentielle Rolle für die Transkription später und sehr später Gene spielen könnte (Partington et al., 1990; Carstens et al., 1994). Ein direkter Beweis für diese Annahme wurde bislang jedoch nicht erbracht.

Durch die Analyse der Virusproduktion wurde deutlich, dass eine LEF-4-Inhibition die Bildung von viralen Einschlusskörpern stark verringert. Plaque-Tests zeigten auch eine geringere Reduktion der Bildung des BV-Phänotyps. Die nicht vollständige Blockierung der Virusnachkommenbildung ist darauf zurückzuführen, dass bei der Transfektion der Insektenzellen vermutlich nicht jede Zelle die dsRNA LEF-4 aufgenommen hat, wenn man Vergleichsexperimente mit eGFP-exprimierender Plasmid-DNA zugrunde legt. Anhand der Western Blot-Analysen erschien die LEF-4-Reduktion nahezu vollständig zu sein, wobei dies daran gelegen haben dürfte, dass das zur Verfügung stehende anti-LEF-4-Antiserum nicht sensitiv genug war, um die nach der RNAi verbleibende LEF-4-Proteinmenge sichtbar zu machen. Die nicht-transfizierten Zellen produzierten demnach genügend Virusnachkommen um Plaques zu bilden, und um in einer geringen Anzahl der Zellen Polyeder auszubilden.

Generell wurde in den RNAi-Studien ersichtlich, dass die Reduktion eines bestimmten Faktors bei der Verwendung von dsRNA Schwankungen unterlag. Einen Grund dafür dürften Variationen in den Transfektionseffizienzen der dsRNAs gespielt haben. Aufgrund der angewendeten Transfektionsmethode wurden die Zellen in den verschiedenen Gewebekulturplatten zudem etwas unterschiedlichem Stress ausgesetzt, wodurch die Zellzahl leicht variiert haben könnte. Dennoch wurden bei der Analyse der Proteinmengen gleiche Volumina der Proteinextrakte pro Spur der Proteingele aufgetragen, da aufgrund der Hyperexpression der sehr späten baculoviralen Proteine die Auftragung gleicher Proteinmengen das Ergebnis für andere Proteine in den Expressionsstudien verfälscht hätte.

Beim Vergleich der RNAi-Studien über die verschiedenen Faktoren wurden Unterschiede der Wirksamkeit der verwendeten dsRNAs offensichtlich. Die Reduktion von DBP und v.a. von LEF-4 schien effizienter zu sein als die von IE2. Dabei hängt die Nachweisbarkeit der Proteinmengen allerdings auch von der Sensitivität der jeweils zur Verfügung stehenden Antikörper ab. Insgesamt konnte anhand der durchgeführten Studien die Funktionalität der RNAi-Technik für das Baculovirussystem demonstriert werden.

Die Beobachtungen der vorgestellten RNAi-Studien über LEF-4 korrelieren mit Untersuchungen von AcMNPV-Genomen, die eine Deletion des *lef-4*-Gens besitzen. Bei diesen Experimenten war die Bildung von AcMNPV-Nachkommen ebenfalls blockiert (persönliche Mitteilung von L.A. Guarino, Texas, USA). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass LEF-4 sowohl ein essentieller Faktor für die späte und sehr späte virale Genexpression ist, als auch für die Produktion von baculoviralen Einschlusskörpern notwendig ist.

5. Welchen Einfluss haben AcMNPV- und HSV-1-Infektionen auf die Expression von TAFs?

Die mRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II erfordert die Aktivitäten von mehr als 70 Polypeptiden, wobei dieser Prozess durch eine Vielzahl unterschiedlicher Interaktionen quantitativ und qualitativ reguliert wird (Übersichtsartikel Albright und Tjian, 2000). Die Modifizierung oder Stabilisierung einer Komponente dieser Maschinerie hat vermutlich Auswirkungen auf die Aktivität einer Vielzahl von assoziierten Faktoren.

Demnach wäre es denkbar, dass es parallel zum Anstieg von TBP zu einer Veränderung von TAF-Proteinmengen in der späten baculoviralen Infektionsphase kommen könnte. Zur

Überprüfung, ob die AcMNPV-Infektion ähnliche Wirkungen auf die Expression von Insekten-TAFs wie auf TBP hat, wurden Expressionsstudien über TAFs im Infektionsverlauf initiiert. Dies geschah auch im Hinblick auf die Annahme, dass die Stabilität von TBP durch eine Interaktion mit TAFs beeinflusst werden könnte.

Analysen von TAFs in den *Lepidopteren*-Zelllinien Sf21 und TN-368 beinhalten die Schwierigkeit, dass keine gegen TAFs der Insektenordnung *Lepidoptera* gerichteten Antikörper zur Verfügung stehen. Da darüber hinaus die Sequenzen der Sf21- oder TN-368-TAFs unbekannt sind, bestand nur die Möglichkeit gegen TAFs der Spezies *Drosophila melanogaster* (dmTAFs) aus der Insektenordnung *Diptera* gerichtete Antikörper auf ihre Spezifität hin in den *Lepidopteren*-Zellen zu testen. Wie in früheren Studien bereits angedeutet wurde (Voß, 2003), scheinen Homologien der TAFs aus den Insektenordnungen *Diptera* und *Lepidoptera* nur eingeschränkt ausgeprägt zu sein. Aufgrund der offensichtlich geringen Reaktivität der *Lepidopteren*-TAFs mit anti-*Drosophila*-TAF-Antikörpern und aufgrund der Tatsache, dass *Drosophila*-Zellen kein permissives System für eine AcMNPV-Infektion darstellen, waren Untersuchungen von TAFs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen nur ansatzweise möglich. Nur gegen dmTAF9 und dmTAF5 gerichtete Antiseren zeigten in Expressionsanalysen in Sf21- und TN-368-Zellen Signale im Bereich der vorhergesagten Molekulargewichte der Proteine.

Unter Verwendung des anti-dmTAF9-Antiserums konnte eine Proteinbande von ca. 40 kDa jedoch nur in der späten AcMNPV-Infektionsphase und damit parallel zum Anstieg des TBP-Proteins nachgewiesen werden. Allerdings wurde dieses Signal in uninfizierten Zellen nicht detektiert und in beiden Zelllinien wurden weitere Proteinbanden erkannt.

Durch den Einsatz des anti-dmTAF5-Kaninchenserums (a) wurde eine Proteinbande detektiert, die mit 90 kDa etwas höher als das berechnete Molekulargewicht des Proteins von 85 kDa lag und erst in der späten Infektionsphase, und somit parallel zum TBP-Anstieg, nachgewiesen werden konnte. Somit ist es möglich, dass die TAF5-Expression durch die Baculovirusinfektion auf ein sichtbares Niveau gehoben wird. Da allerdings in uninfizierten Zellen kein Signal nachweisbar war und ein zweites anti-dmTAF5-Kaninchenserum ein weiteres Protein erkannte, das zudem ein anderes Auftreten im Zeitverlauf hatte, bleibt die Spezifität der Signale zweifelhaft.

Die vorgestellten Ergebnisse deuten an, dass TAF5 und TAF9 in AcMNPV-infizierten Insektenzellen in der späten Infektionsphase parallel zu TBP verstärkt exprimiert werden könnten.

Aufgrund der beschränkten Einsatzmöglichkeiten mit den zur Verfügung stehenden anti-dmTAF-Antikörpern in *Lepidopteren*-Zellen, sollten weitere anti-TAF-Antiseren hergestellt werden. Da die DNA-Sequenzen von *Lepidopteren*-TAFs bis heute nicht bekannt sind, wurden Antikörper gegen eine größere Zahl von *Drosophila*-TAFs produziert. In Kooperation mit der Southwestern Universität in Dallas, Texas, USA wurden polyklonale Mausseren, die gegen ausgesuchte Bereiche der dmTAFs gerichtet sind, mit Hilfe von „genetischer Immunisierung“ der Mäuse gewonnen. Dazu wurden den Mäusen DNA-Fragmente mit den Sequenzen von dmTAF1, dmTAF3, dmTAF4, dmTAF5, dmTAF6, dmTAF9, dmTAF10 oder dmTAF10b injiziert und die gewonnenen Seren anti-dmTAF3, anti-dmTAF4, anti-dmTAF6 und anti-dmTAF10 auf ihre Spezifität in den Zelllinien Sf21 und TN-368 getestet. Es zeigte sich allerdings, dass diese Mausseren für den Einsatz in den *Lepidopteren*-Zelllinien aufgrund von zu großen unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen nicht geeignet waren (Daten nicht gezeigt).

Nach den Expressions- und Lokalisierungsstudien über TBP und TAFs während der AcMNPV-Infektion, sollten Vergleichsanalysen in einem Virussystem angefertigt werden, in dem im Gegensatz zum Baculovirussystem die zelluläre RNA-Polymerase II die virale Genexpression im gesamten Infektionszyklus vermittelt, und es zu keiner Hyperexpression sehr später Gene kommt. Zur Untersuchung, ob Expressionssteigerungen von TFIID-Komponenten durch das humanpathogene große DNA-Virus HSV-1 hervorgerufen werden können, wurde der Einfluss der HSV-1-Infektion auf die Proteinmenge von TBP und TAFs untersucht. Das humane Zellkultursystem bietet den Vorteil einer großen Zahl spezifischer TAF-Antikörper.

Im HSV-1-Infektionsverlauf wurden keine Veränderungen der TBP- und TAF-Proteinmengen ersichtlich. In der späten Infektionsphase reduzierten sich die TBP- und TAF-Mengen aufgrund der Lyse der Zellen. Somit hat die HSV-1-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TFIID-Komponenten. Im Infektionsverlauf von HSV-1 werden sowohl die frühen als auch die späten viralen Gene von der Wirts-RNA-Polymerase II transkribiert. Daher wird angenommen, dass TBP an der Transkription früher und später Gene beteiligt ist. Im Gegensatz zu der sehr späten Baculovirusinfektionsphase kommt es während des HSV-1-Infektionszyklus nicht zu einer Überexpression sehr später viraler Gene. Möglicherweise korreliert die TBP-Zunahme während der AcMNPV-Infektion mit der Hyperexpression der sehr späten viralen Gene durch eine viruskodierte RNA-Polymerase.

In Abb. 46 ist dieses Modell schematisch dargestellt. Es ist die Anlagerung von TBP, TAF5 und TAF9 an einen frühen, TATA-Box-enhaltenden AcMNPV-Promotor dargestellt, wodurch die Expression eines frühen viralen Gens durch die zelluläre RNA-Polymerase II (RNAP II) vermittelt wird. Zu diesem Infektionszeitpunkt liegt nur ein kleiner „Pool“ von TBP und der TAFs vor (Abb. 46 A links). Die Expression sehr später baculoviraler Gene erfolgt durch die viruskodierte RNA-Polymerase (vRNAP) von TATA-Box-losen Promotoren. Anhand der vorgestellten Ergebnisse kann vermutet werden, dass an der Hyperexpression der sehr späten Baculovirusgene die gestiegenen Mengen von TBP und eventuell der TAFs 5 und 9 beteiligt sind (Abb. 46 A rechts). Die Expression früher und später HSV-1 Gene wird von TATA-Box-enhaltenden Promotoren durch die zelluläre RNAP II unter Verwendung von TBP und TAFs vermittelt, deren Proteinmenge während des Infektionszyklus unverändert bleibt (Abb. 46 B). Im Infektionszyklus beider Virussysteme kommt es zu einer Relokalisierung der basalen Transkriptionsfaktoren in virale DNA-Replikationszentren.

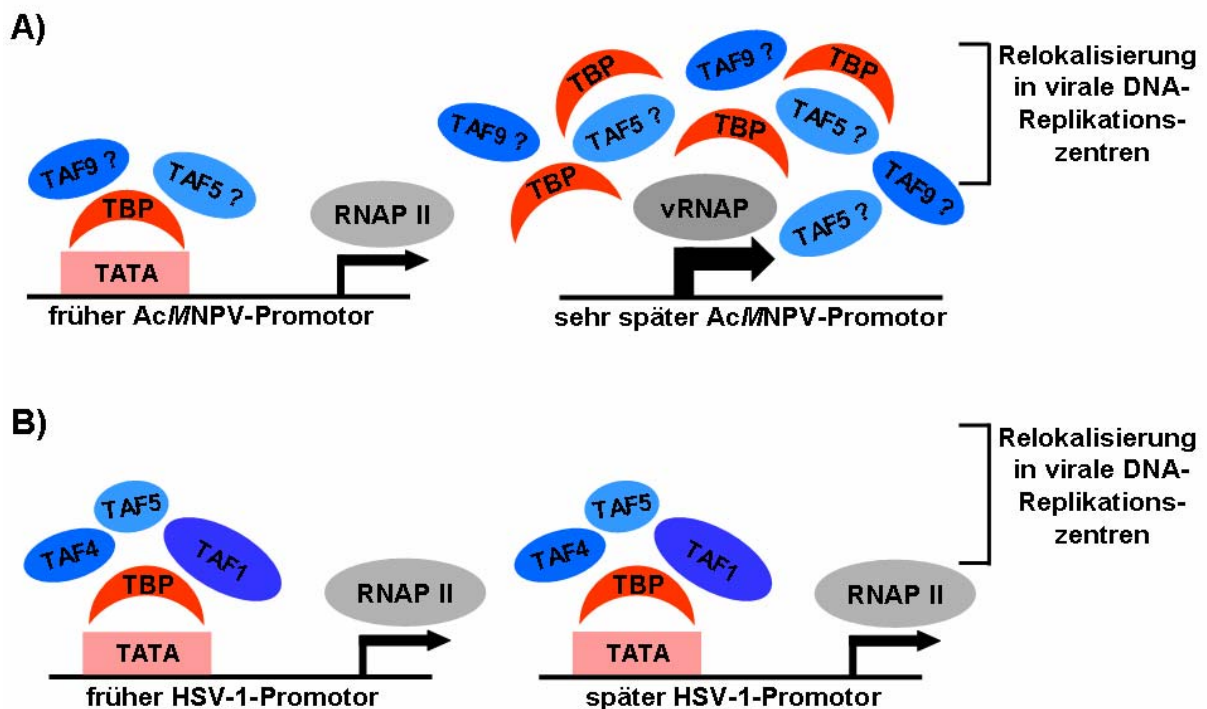


Abb. 46: Skizze zur Anlagerung basaler Transkriptionsfaktoren an frühe und späte Promotoren großer DNA-Viren

A) TBP und TAF-Verteilungen an frühen und sehr späten baculoviralen Promotoren stellen die Zunahme von TBP und den wahrscheinlichen Anstieg von TAF5 und TAF9 bei der Transkription der sehr späten Promotoren durch die viruskodierte RNA-Polymerase (vRNAP) dar. **B)** Anlagerung von TBP und TAFs an frühen und späten HSV-1-Promotoren mit gleich bleibender Menge der Transkriptionsfaktoren. In beiden Virussystemen kommt es zu einer Relokalisierung der TFIID-Untereinheiten in virale DNA-Replikationszentren.

6. Subzelluläre Relokalisierungen von TFIID-Komponenten: Ein konservierter Mechanismus im Infektionsverlauf großer DNA-Viren

Die virale Replikation und Transkription finden in gemeinsamen Kernstrukturen statt. Dies ist für HSV-1-infizierte Zellen beschrieben worden, in denen in Kolo-kalisierungsstudien die Wirts-RNA-Polymerase mit viralen Replikationsorten assoziiert, und ist zudem in Lokalisierungsstudien mit direkt markierten Stellen der DNA- und RNA-Synthese gezeigt worden (Rice et al., 1994; Leopardi et al., 1997; Phelan et al., 1997).

Dies bedeutet, dass Replikationsfaktoren und Transkriptionsfaktoren zu den gleichen Stellen im Zellkern rekrutiert werden müssen. Wie dies durch die virale Infektion gesteuert wird ist unklar und eine hoch komplexe Fragestellung.

Lokalisierungsstudien dieser Arbeit zeigten während der AcMNPV-Infektion eine Relokalisierung von TBP und möglicherweise von TAF5 in virale Replikationszentren. Um Hinweise zur Allgemeingültigkeit der Relokalisierung von basalen Transkriptionsfaktoren im Infektionsverlauf großer DNA-Viren zu erhalten, wurden Vergleichsanalysen der Lokalisierung von TBP und TAFs in HSV-1-infizierten, primären, humanen Zellen angefertigt.

Immunfluoreszenzstudien der vorliegenden Arbeit zeigten während der HSV-1-Infektion Umstrukturierungen der RNAP II, TBP und hsTAFs von einem granulären Färbemuster in uninfizierten humanen Zellen in distinkte Kerndomänen ab 2 h p.i.. Durch die hier vorgestellten Ergebnisse konnte erstmals die gleichzeitige Relokalisierung von TBP, hsTAF1 und hsTAF4 an Stellen der HSV-1-DNA-Replikation aufgezeigt und erste Hinweise für eine gemeinsame Rolle der Proteine in der viralen Transkription geliefert werden.

Die Proteinzusammensetzung der HSV-1-Replikationszentren zeigt eine Kopräzipitation von BTAF1 (TAF170 bzw. TAF172) (van der Knaap et al., 1997) mit dem viralen Einzelstrang-DNA-bindenden Protein ICP8 (Taylor und Knipe, 2004). BTAF1 und TBP bilden den B-TFIID-Komplex, der sich in seinen biochemischen Eigenschaften von TFIID unterscheidet (Timmers und Sharp, 1991). Da BTAF-1 die TBP-DNA-Komplexbildung inhibieren kann (Pereira et al., 2001), kann über gegensätzliche Rollen von TFIID und B-TFIID während der viralen Transkription spekuliert werden.

In dieser Arbeit wurde ein zur Verfügung stehendes anti-BTAF-1-Antiserum in Expressionsstudien in HFFF2-Zellen getestet, um Vergleichsstudien zu TBP durchführen zu können. In diesen Zellen war es jedoch nicht möglich ein spezifisches Signal für BTAF-1 nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Die Umstrukturierung von TBP und hsTAFs in virale Replikationszentren verlief simultan und in Abhängigkeit von replizierender viraler DNA. Die initiale Relokalisierung von TBP und TAFs in nukleäre Domänen geschah ebenfalls unter Hemmung der Virus-DNA-Replikation. Dies legt nahe, dass die initiale Lokalisierung basaler Transkriptionsfaktoren mit dem Erscheinen von ICP4 in Präreplikationszentren einhergeht und unabhängig von der frühen viralen DNA-Replikation ist. Dagegen scheint die Größenzunahme der Replikationszentren eine Voraussetzung für die Ausbildung der vergrößerten Kerndomänen der Transkriptionsfaktoren zu sein.

Schon früher wurde bei Studien mit Herpesviren und Adenoviren beobachtet, dass nach der Freisetzung viraler Genome in das Nukleoplasma die Initiation der viralen Replikation an einer limitierten Anzahl nukleärer Domänen geschieht, bei denen es sich um ND10 (nuclear domain 10) handelt (Maul, 1998). Daraus wurde die Depot-Hypothese aufgestellt, dass virale Genome gerichtet zu präexistierenden Domänen transportiert werden, um aus dieser Umgebung Vorteile für ihre eigene Replikation zu ziehen (Maul, 1998). In BmNPV-infizierten Insektenzellen ist ebenfalls die Anzahl der Replikationszentren bestimmt worden, wobei die Zahl von 15 Replikationszentren pro Zellkern auch bei hohen Infektionsmultiplizitäten nicht überschritten wird. Diese Beobachtung hat zu der Vermutung geführt, dass auch in Insektenzellen eine limitierte Anzahl präexistierender Replikationsorte vorkommt (Okano et al., 1999).

Kürzlich ist berichtet worden, dass zumindest einige der frühen HSV-1 ICP4-Strukturen parentale Virus-Genome enthalten, die sich zu viralen Replikations-Kompartimenten entwickeln. Daraus wurde geschlossen, dass ICP4 zu parentalen viralen Genomen rekrutiert wird, kurz nachdem diese in den Zellkern freigesetzt werden (Everett et al., 2004). Längere Zeit wurde vermutet, dass die HSV-1-DNA während des lytischen Infektionszyklus leicht zugänglich sei (Muggeridge und Fraser, 1986). Neuere Ergebnisse liefern allerdings Hinweise auf ein partiell nukleosomal organisiertes virales Genom. Die assoziierten Histone tragen kovalente Modifikationen, die repräsentativ sind für transkriptionell aktive zelluläre Gene (Kent et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass durch die Freisetzung der parentalen Virusgenome mit einer großen Dichte an TATA-Sequenzen eine verstärkte TBP-Bindung stattfindet, woraufhin wiederum eine Rekrutierung der TAFs erfolgt. Durch die Replikation der viralen Genome nimmt die Zahl der potentiellen TBP-Bindungsstellen massiv zu, wodurch es zu einer weiteren Akkumulation der TFIID-Untereinheiten in den viralen DNA-Replikationszentren kommt. Der Mechanismus, dass die virale Transkription im

Infektionsverlauf großer DNA-Viren an Orten der viralen DNA-Synthese unter Einbeziehung einer Rekrutierung von TFIID-Komponenten stattfindet, ist offensichtlich konserviert. Dies könnte bedeuten, dass die replizierte virale DNA sofort für die Transkription zugänglich ist, so dass entsprechende Transkriptionsfaktoren in Replikationszentren rekrutiert werden müssen. Es wird von großem Interesse sein zu untersuchen, ob an die parentalen Genome bereits virale bzw. zelluläre DNA-bindende Proteine assoziiert sind wenn diese in den Zellkern eindringen.

7. Ausblick

7.1. Analysen des Mechanismus und der Bedeutung des TBP-Proteinanstiegs in AcMNPV-infizierten Insektenzellen

Diese Arbeit beschreibt den Anstieg der TBP-Proteinmenge in der späten Phase des baculoviralen Infektionszyklus, wobei TBP in AcMNPV-infizierten TN-368-Zellen im Gegensatz zur Zelllinie Sf21 in der sehr späten Infektionsphase nicht mehr nachweisbar ist. Die TBP-Aktivität und möglicherweise auch -Stabilität könnte auf der einen Seite durch Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren und auf der anderen Seite durch Phosphorylierungen beeinflusst werden (Yuan et al., 2001). Phosphoryliertes TBP scheint sowohl eine regulatorische Funktion während der M-Phase des Zellzyklus inne zu haben (Leresche et al., 1996), als auch zu einer Steigerung der Aktivität der RNAP II zu führen (Chibazakura et al., 1997). Proteinkinase CK2-vermittelte TBP-Phosphorylierungen verringern dagegen in Hefe-Zellen die TBP-Bindungsaffinität zur TATA-Box (Maldonado und Allende, 1999).

Eine Änderung des Phosphorylierungsgrades von TBP könnte einen stabilisierenden Einfluss auf die Assoziation von TBP mit TAFs oder anderen Aktivatoren und Repressoren haben. Es wäre vorstellbar, dass diese Interaktionen durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von TBP aufgehoben werden und dies ein Signal für die gezielte Proteolyse des Proteins in der sehr späten Infektionsphase in TN-368-Zellen darstellt. Somit könnten Untersuchungen des Phosphorylierungsgrades bzw. der Einsatz von Phosphatasen Hinweise auf den Regulationsmechanismus von TBP liefern.

Anhand der Kollokalisierungsstudien dieser Arbeit ergab sich keine Evidenz für ubiquitiniertes TBP. Da auch für nicht-ubiquitinierte Proteine gezeigt worden ist, dass sie

durch das Proteasom erkannt und eliminiert werden können (Bercovich et al., 1989; Sheaff et al., 2000; Kalejta und Shenk, 2003), kann eine proteasomale Degradation von TBP während der sehr späten Virusinfektion in TN-368-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Direkte Untersuchungen des TBP-Abbaus über das Proteasom-System könnten durch die Verwendung von Proteasomeninhibitoren wie z.B. MG132 angestellt werden.

Die Identifikation von zellulären oder viralen Faktoren, die einerseits durch Protein-Protein-Interaktionen das TBP-Protein stabilisieren, und andererseits die Rekrutierung von TBP in virale Replikationsorte regulieren könnten, ist mit Hilfe von Studien durch das Hefe-2-Hybridsystem denkbar. Dazu sollten repräsentative cDNA-Bibliotheken aus mRNA von uninfizierten Insektenzellen hergestellt werden und mit denen aus Zellen der späten AcMNPV-Infektionsphase verglichen werden. Die daraus resultierenden positiven Kandidaten könnten durch Sequenzierung und anschließende Homologievergleiche mit bekannten Sequenzen näher charakterisiert werden.

Zur Analyse der Bedeutung des TBP-Anstiegs könnten *in vitro*-Transkriptionsversuche hilfreich sein, die einen möglichen direkten Einfluss von TBP auf die Promotoren der Gene polyhedrin und p10 zeigen könnten. Dazu sollte TBP aus Proteinextrakten der Zelllinien Sf21 bzw. TN-368 über Säulen-gebundene anti-TBP-Antikörper depletiert werden. Die TBP-freien Proteinextrakte könnten daraufhin in *in vitro*-Transkriptionsexperimenten mit Promotor-Konstrukten der sehr späten baculoviralen Faktoren p10 und polyhedrin mit einer nachgeschalteten Reportergen-kassette, wie dem Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), eingesetzt werden (Mans und Knebel-Mörsdorf, 1998). Um die Wirkung von TBP auf die durch die sehr späten viralen Promotoren gesteuerte Transkription zu überprüfen, sollte den Transkriptionsansätzen bakteriell überexprimiertes und aufgereinigtes Sf-TBP zugegeben werden, dessen Funktionalität zuvor überprüft werden müsste. Dadurch könnten Einblicke in die Funktion der TBP-Zunahme im baculoviralen Infektionsverlauf gewonnen werden, um diesen ungewöhnlichen Aspekt der Virus-Wirtszell-Interaktion weiter aufzuklären.

7.2. RNAi-Studien über den Mechanismus der DBP-Wirkung auf LEFs

Die hier gezeigten RNAi-Studien ergaben den interessanten Aspekt, dass durch Reduktion von AcMNPV DBP die Proteinmenge von LEFs in der späten und sehr späten Infektionsphase erhöht vorliegt. Zur Untersuchung, ob die Zunahme der LEFs auf transkriptioneller

Ebene oder durch eine Stabilisierung der Proteine beruht, sollte die mRNA-Synthese von LEF-3, LEF-4 und P35 durch Northern Blot-Analysen oder durch quantitative „Real-time-PCR“-Studien analysiert werden.

Anhand der ausgewerteten Experimente war keine deutliche Wirkung der DBP-Reduktion und der damit einhergehenden Steigerung der LEF-Proteinmengen auf die Expression später und sehr später viraler Proteine oder auf die Produktion von viralen Einschlusskörpern festzustellen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die gesteigerten LEF-Proteinmengen einen Einfluss auf den BV-Phänotyp von AcMNPV erkennen lassen, wozu Plaque Test-Studien mit Zellkulturüberständen in der späten Infektionsphase durchgeführt werden sollten.

Die Transfektion von dsRNA DBP zeigte in initialen Lokalisierungsstudien eine deutliche Verminderung von Zellen, die DBP-Kerndomänen aufwiesen. Dies bietet die Möglichkeit in künftigen Lokalisierungsstudien die Notwendigkeit der DBP-Domänenbildung für die Rekrutierung anderer Faktoren zu Orten replizierender DNA und für die Ausbildung der viralen Replikationszentren genauer zu untersuchen.

VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über den Einfluss großer DNA-Viren auf den basalen Transkriptionsapparat der Wirtszellen zu erlangen. Während der Infektion des Baculovirus AcMNPV kommt es in der sehr späten Infektionsphase zur Hyperexpression viraler Faktoren. Während die frühen Virusgene von der zellulären RNAP II transkribiert werden, wird die Expression der späten und sehr späten baculoviralen Faktoren von einer viruskodierten RNA-Polymerase vermittelt. Über zelluläre Faktoren, die an der späten oder sehr späten viralen Genexpression beteiligt sind, war bisher nichts bekannt.

In dieser Arbeit ergaben Untersuchungen der Expression des basalen Transkriptionsfaktors TBP einen signifikanten Anstieg der TBP-Proteinmenge in den späten Phasen der Infektion. Der TBP-Anstieg verlief unterschiedlich in den permissiven Insektenzelllinien Sf21 und TN-368. In Sf21-Zellen war eine TBP-Zunahme ab 16 h p.i. bis in die sehr späte Infektionsphase 72 h p.i. zu beobachten. In TN-368-Zellen nahm die Menge von TBP ab 8 h p.i. bis zu einem Signalthöhepunkt bei 16 h p.i. zu, bevor ab 24 h p.i. eine leichte und ab 48 h p.i. eine deutliche Abnahme des TBP-Proteins zu verzeichnen war.

Dieses ungewöhnliche Ergebnis steht im Widerspruch zu der bisherigen Annahme und Beobachtung, dass die Expression der meisten zellulären Gene während des baculoviralen Infektionsverlaufs herunter reguliert wird. Northern Blot-Analysen zeigten, dass die Zunahme des TBP-Proteins in der späten Phase der Baculovirusinfektion nicht von einer verstärkten Transkription des *tbp*-Gens herrührt. Daraus ergab sich die Frage, wie der TBP-Anstieg durch das Virus induziert wird und welche Bedeutung er für die Infektion hat.

Nach Hemmung der Translation konnte eine hohe Stabilität von TBP in uninfizierten Insektenzellen von bis zu 72 Stunden nachgewiesen werden. Daher könnte der plötzliche Abfall der TBP-Proteinmenge ab 24 h p.i. in TN-368-Zellen auf einen aktiven virus-induzierten Abbaumechanismus von TBP hindeuten.

Als möglicher TBP-Degradationsweg wurde das Ubiquitin-Proteasom-System untersucht. Das sehr früh exprimierte virale IE2-Protein wird als E3-Ligase angesehen und somit wird ihm eine Beteiligung am Ubiquitin-Proteasomen-Proteinabbauweg zugesprochen. Durch Lokalisierungsstudien konnte in der frühen Infektionsphase erstmals eine Kolo-kalisierung von IE2-Kerndomänen mit konjugiertem Ubiquitin nachgewiesen werden, wodurch die Hypothese der E3-Ligase-Aktivität von IE2 unterstützt werden konnte. In der frühen Phase der Infektion assoziierten die kolo-kalisierenden Strukturen von IE2 und konjugiertem Ubiquitin zudem mit TBP-Kerndomänen, jedoch konnte kein direkter Zusammenhang des Ubiquitin-Proteasomen-

Weges mit der TBP-Abnahme in der sehr späten Infektionsphase in TN-368-Zellen hergestellt werden. AcMNPV exprimiert ein Ubiquitinhomolog, das als möglicher Ubiquitin-Ketten-terminator fungieren könnte. Um Hinweise zu erhalten, ob virales Ubiquitin eventuell indirekt am TBP-Abbau beteiligt ist, wurden Infektionsstudien mit AcMNPV-Mutanten, die ein nicht funktionsfähiges v-ubi-Gen tragen, analysiert. Die Mutanten bewirkten keine Veränderungen der subzellulären Lokalisierung von konjugiertem Ubiquitin, jedoch eine Reduktion der als IE2-Abbauprodukte vermuteten fadenförmigen IE2-Kernstrukturen.

Infektionsstudien mit wt AcMNPV zur subzellulären TBP-Lokalisierung zeigten eine TBP-Umstrukturierung von einem granulären Färbemuster im gesamten Zellkern in distinkte Kerndomänen ab 4 h p.i., die zu größeren Kernstrukturen in der späten Infektionsphase fusionierten, so dass TBP ab 16 h p.i. in einer einzelnen, großen Struktur im Zellkern lokalisierte. Es zeigte sich, dass TBP mit viralen DNA-Replikationszentren kolokalisierte, sobald Orte der viralen DNA-Synthese in distinkten Kerndomänen sichtbar wurden. Durch Inhibition der viralen Replikation oder der Proteinsynthese wurde deutlich, dass die TBP-Relokalisierung funktionell an die Entstehung viraler Replikationszentren gekoppelt war. Durch die Beobachtung der Kolokalisierung von TBP mit der zellulären RNAP II konnten Hinweise auf die vermutete Beteiligung von TBP an der frühen baculoviralen Transkription gewonnen werden.

Mit Hilfe der RNA-Interferenz sollte die Bedeutung von TBP für die späte virale Genexpression analysiert werden. Aufgrund der erwarteten komplexen Situation bei der Reduktion eines stabilen und eventuell essentiellen zellulären Faktors wurden zur Etablierung der Methode RNAi-Studien für die viralen Transkriptions- und Replikationsfaktoren IE2, DBP und LEF-4 durchgeführt, von denen teilweise angenommen wird, dass sie essentiell für die virale Infektion sind. Zudem sollten Hinweise auf die Funktionen der untersuchten AcMNPV-Faktoren für den viralen Infektionsverlauf gewonnen werden.

Die Reduktion des AcMNPV IE2-Proteins führte weder zu einem Expressionsunterschied der untersuchten frühen und späten viralen Faktoren, noch konnte ein Einfluss auf die TBP-Expression oder auf die Virusproduktion festgestellt werden. Dies lieferte einen Beleg für eine nicht essentielle Funktion von IE2 für die Virusinfektion in Zellkultur. Die Expression der frühen viralen Proteine und von TBP blieb durch die Inhibition des postulierten AcMNPV-Replikationsfaktors DBP ebenfalls unverändert. Dagegen konnte nach der Reduktion von DBP eine signifikante Erhöhung der Proteinmengen von viralen LEF-Proteinen in der späten Phase der Infektion festgestellt werden. Diese LEF-Zunahmen hatten keinen messbaren Effekt auf die Synthese viraler Strukturproteine oder auf die Bildung von

Virus-Polyedern. RNAi-Studien über die viruskodierte RNA-Polymerase-Untereinheit LEF-4 hatten keinen Einfluss auf die frühe Virusproteinbildung oder auf TBP. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass LEF-4 für die späte virale Strukturproteinsynthese und die Virusproduktion notwendig ist. Durch die Verwendung von dsRNA TBP konnte die TBP-Proteinmenge nur in uninfizierten Zellen reduziert werden. In der späten Infektionsphase waren hingegen keine Verringerung der TBP-Menge und kein Einfluss auf die Expression viraler Faktoren oder die Bildung von viralen Einschlusskörpern auszumachen.

Es wurden Vergleichsanalysen während der HSV-1-Infektion durchgeführt, bei der die Wirts-RNAP II die virale Genexpression im gesamten Infektionszyklus vermittelt, und es zu keiner Hyperexpression sehr später Gene kommt. In HSV-1-infizierten primären humanen Fibroblasten zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die Expression von TFIID-Komponenten. In Lokalisierungsstudien konnten sowohl für die RNAP II, als auch für die exemplarisch untersuchten TFIID-Untereinheiten TBP, TAF1 und TAF4 Umstrukturierungen von granulären Färbemustern im gesamten Zellkern in distinkte Kerndomänen ab 2 h p.i. beobachtet werden. Diese Kernstrukturen kolokalisierten mit viralen Replikationszentren und nahmen simultan und in Abhängigkeit von den Orten der viralen DNA-Synthese an Größe zu. Dabei schien die initiale Relokalisierung der basalen Transkriptionsfaktoren in Präreplikationszentren unabhängig von replizierender viraler DNA stattzufinden. Dies legt den Schluss nahe, dass die freigesetzten Virusgenome direkt für die Transkription zugänglich sind, so dass basale Transkriptionsfaktoren in Replikationszentren rekrutiert werden.

Diese Studien zeigen erstmals die Induktion der TBP-Proteinzunahme durch ein großes DNA-Virus und legen nahe, dass TBP für die Hyperexpression der sehr späten Baculovirusgene benötigt wird. Die Relokalisierung von TBP und TAFs während der Infektion großer DNA-Viren deutet auf einen konservierten Mechanismus der viralen Transkription an Orten der viralen DNA-Synthese hin. Durch die Etablierung der RNA-Interferenz im baculoviralen Infektionsverlauf eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Erforschung basaler Transkriptionsfaktoren und viraler Transkriptions- und Replikationsproteine.

VII. Literaturverzeichnis

Acharya, A., and Gopinathan, K.P. (2002)

Characterization of late gene expression factors lef-9 and lef-8 from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 83:2015-23.

Albright, S.R., and Tjian, R. (2000)

TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242:1-13.

Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., and Possee, R.D. (1994)

The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202:586-605.

Bandara, L.R., and La Thangue, N.B. (1991)

Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351:494-7.

Banerji, J., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1981)

Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27:299-308.

Baucke, R.B., and Spear, P.G. (1979)

Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein. *J. Virol.* 32:779-89.

Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A., and Kahana, C. (1989)

Degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate is ATP-dependent but ubiquitin-independent. *J. Biol. Chem.* 264:15949-52.

Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977)

Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3171-5.

Berk, A.J., and Sharp, P.A. (1978)

Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* 14:695-711.

Berk, A.J. (2000)

TBP-like factors come into focus. *Cell* 103:5-8.

Besse, S., Vigneron, M., Pichard, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1995)

Synthesis and maturation of viral transcripts in herpes simplex virus type 1 infected HeLa cells: the role of interchromatin granules. *Gene Expr.* 4:143-61.

Birck, C., Poch, O., Romier, C., Ruff, M., Mengus, G., Lavigne, A.C., Davidson, I., and Moras, D. (1998)

Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family. *Cell* 94:239-49.

Bishop, D.H.L. (1988)

The release into the environment of genetically engineered viruses, vaccines and viral pesticides. *Trends Biotechnol.* 6:12-5.

Blissard, G.W., Quant-Russel, R.L., Rohrman, G.F., and Beaudreau, G.S. (1989)

Nucleotide sequence, transcriptional mapping and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of Orgyia pseudotsugata. *Virology* 168:354-62.

Blissard, G.W., and Rohrmann, G.F. (1989)

Location, sequence, transcriptional mapping and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 170:537-55.

- Blissard, G.W., and Rohrmann, G.F. (1990)**
Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35:127-55.
- Blissard, G.W., and Rohrmann, G.F. (1991)**
Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J. Virol.* 65:5820-7.
- Blissard, G.W. (1996)**
Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20:73-93.
- Bolden, A., Aucker, J., and Weissbach, A. (1975)**
Synthesis of herpes simplex virus, vaccinia virus, and adenovirus DNA in isolated HeLa cell nuclei. I. Effect of viral-specific antisera and phosphonoacetic acid. *J. Virol.* 16:1584-92.
- Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R.D. (2002)**
Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J. Virol.* 76:841-50.
- Boyce, F.M., and Bucher, N.L. (1996)**
Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2348-52.
- Boyce, F. (1999)**
Non-chemical gene transfer into mammalian cells. A new DNA transduction system based on baculovirus. *InNovations, Newsletter of Novagen, Inc.*, Advanced products and protocols for molecular biology research, Number 9:1-4.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., and Broach, J.R. (1993)**
Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* 7:592-604.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998)**
A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* 17:5964-73.
- Brown, M., and Faulkner, P. (1977)**
A plaque assay for nuclear polyhedrosis viruses using a solid overlay. *J. Gen. Virol.* 36:361-4.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989)**
Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56:549-61.
- Caplen, N.J., Zheng, Z., Falgout, B., and Morgan, R.A. (2002)**
Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. *Mol. Ther.* 6:243-51.
- Carrozza, M.J., and DeLuca, N.A. (1996)**
Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Mol. Cell. Biol.* 16:3085-93.
- Carson, D.D., Guarino, L.A., and Summers, M.D. (1988)**
Functional mapping of an AcNPV immediately early gene which augments expression of the IE-1 trans-activated 39K gene. *Virology* 162:444-51.
- Carson, D.D., Summers, M.D., and Guarino, L.A. (1991 a)**
Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J. Virol.* 65:945-51.
- Carson, D.D., Summers, M.D., and Guarino, L.A. (1991 b)**
Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology* 182:279-86.
- Carstens, E.B., Tjia, S.T., and Doerfler, W. (1979)**
Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 99:386-98.

- Carstens, E.B., Chan, H., Yu, H., Williams, G.V., and Casselman, R. (1994)**
Genetic analyses of temperature-sensitive mutations in baculovirus late expression factors. *Virology* 204:323-37.
- Chalkley, G.E., and Verrijzer, C.P. (1999)**
DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18:4835-45.
- Charlton, C.A., and Volkman, L.E. (1993)**
Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* 197:245-54.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. (1991)**
The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-61.
- Chen, Z., and Manley, J.L. (2000)**
Robust mRNA transcription in chicken DT40 cells depleted of TAF(II)31 suggests both functional degeneracy and evolutionary divergence. *Mol. Cell. Biol.* 20:5064-76.
- Chen, Z., and Manley, J.L. (2003)**
In vivo functional analysis of the histone 3-like TAF9 and a TAF9-related factor, TAF9L. *J. Biol. Chem.* 278:35172-83.
- Chen, Z., and Carstens, E.B. (2005)**
Identification of domains in Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus late expression factor 3 required for nuclear transport of P143. *J. Virol.* 79:10915-22.
- Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1995)**
Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267:531-6.
- Chibazakura, T., Watanabe, F., Kitajima, S., Tsukada, K., Yasukochi, Y., and Teraoka, H. (1997)**
Phosphorylation of human general transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB by DNA-dependent protein kinase--synergistic stimulation of RNA polymerase II basal transcription in vitro. *Eur. J. Biochem.* 247:1166-73.
- Chisholm, G.E., and Henner, D.J. (1988)**
Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.* 62:3193-200.
- Chong, J.A., Moran, M.M., Teichmann, M., Kaczmarek, J.S., Roeder, R., and Clapham, D.E. (2005)**
TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol. Cell. Biol.* 25:2632-43.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977)**
An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12:1-8.
- Clem, R.J. (2001)**
Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ.* 8:137-43.
- Clem, R.J. (2005)**
The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289:113-29.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. (2000)**
Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97:6499-503.

Coburn, G.A., and Cullen, B.R. (2002)

Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J. Virol.* 76:9225-31.

Coleman, R.A., Taggart, A.K., Benjamin, L.R., and Pugh, B.F. (1995)

Dimerization of the TATA binding protein. *J. Biol. Chem.* 270:13842-9.

Colgan, J., and Manley, J.L. (1992)

TFIID can be rate limiting in vivo for TATA-containing, but not TATA-lacking, RNA polymerase II promoters. *Genes Dev.* 6:304-15.

Condit, C.C. (2001)

Principles of Virology. In: Fields Virology, Fourth Edition, edited by Knipe, D.M., Howley, P.M., et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, chapter 2.

Cox, J.M., Hayward, M.M., Sanchez, J.F., Gegnas, L.D., van der Zee, S., Dennis, J.H., Sigler, P.B., and Schepartz, A. (1997)

Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:13475-80.

Davidson, I. (2003)

The genetics of TBP and TBP-related factors. *Trends Biochem. Sci.* 28:391-8.

DeLuca, N.A., McCarthy, A.M., and Schaffer, P.A. (1985)

Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol.* 56:558-70.

DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1999)

The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274:22123-6.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998)

SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* 2:233-9.

Dikstein, R., Ruppert, S., and Tijan, R. (1996)

TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* 84:781-90.

Du, X., and Thiem, S. (1997)

Responses of insect cells to baculovirus infection: Protein synthesis shutdown and apoptosis. *J. Virol.* 71:7866-72.

Dubrovskaya, V., Lavigne, A.C., Davidson, I., Acker, J., Staub, A., and Tora, L. (1996)

Distinct domains of hTAFII100 are required for functional interaction with transcription factor TFIIF beta (RAP30) and incorporation into the TFIID complex. *EMBO J.* 15:3702-12.

Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., and Krainc, D. (2002)

Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296:2238-43.

Dunphy, E.L., Johnson, T., Auerbach, S.S., and Wang, E.H. (2000)

Requirement for TAF(II)250 acetyltransferase activity in cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 20:1134-9.

Durantel, D., Croizier, G., Ravallec, M., and Lopez-Ferber, M. (1998)

Temporal expression of the AcMNPV lef-4 gene and subcellular localization of the protein. *Virology* 241:276-84.

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003)

Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:457-67.

Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983)

The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35:79-87.

Dynlacht, B.D., Weinzierl, R.O., Admon, A., and Tjian, R. (1993)

The dTAFII80 subunit of Drosophila TFIID contains beta-transducin repeats. *Nature* 363:176-9.

Evans, J.T., and Rohrmann, G.F. (1997)

The baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, forms a homotrimer in solution. *J. Virol.* 71:3574-9.

Everett, R.D. (2000)

ICP0 induces the accumulation of colocalizing conjugated ubiquitin. *J. Virol.* 74:9994-10005.

Everett, R.D., Sourvinos, G., Leiper, C., Clements, J.B., and Orr, A. (2004)

Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection: localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J. Virol.* 78:1903-17.

Federici, B.A. (1997)

Baculovirus pathogenesis.

In: The Baculoviruses. (Miller, L.K., Ed.), *Plenum Press*, New York, 33-59.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998)

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-11.

Freemont, P.S., Hanson, I.M., and Trowsdale, J. (1991)

A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64:483-4.

Friesen, P.D., and Miller, L. (2001)

Insect viruses. In: *Fields Virology*, Fourth Edition, edited by Knipe, D.M., Howley, P.M., et al., *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia, USA, chapter 20.

Fuchs, L.Y., Woods, M.S., and Weaver, R.F. (1983)

Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 48:641-6.

Fuhrman, J.A. (1999)

Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-8.

Fujigasaki, H., Martin, J.J., De Deyn, P.P., Camuzat, A., Deffond, D., Stevanin, G., Dermaut, B., Van Broeckhoven, C., Durr, A., and Brice, A. (2001)

CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124:1939-47.

Gangloff, Y.G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D., and Davidson I. (2000)

The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol. Cell Biol.* 20:340-51.

Gangloff, Y.G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S., and Davidson, I. (2001)

The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem. Sci.* 26:250-7.

Gardiner, G.R., and Stockdale, H. (1975)

Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 25:363-70.

Geisberg, J.V., Chen, J.L., and Ricciardi, R.P. (1995)

Subregions of the adenovirus E1A transactivation domain target multiple components of the TFIID complex. *Mol. Cell Biol.* 15:6283-90.

Geisberg, J.V., and Struhl, K. (2000)

TATA-binding protein mutants that increase transcription from enhancerless and repressed promoters in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 20:1478-88.

Gerber, H.P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1994)

Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263:808-11.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., and Tjian, R. (1994)

A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:192-6.

Goldfarb, D.S., Garipey, J., Schoolnik, G., and Kornberg, R.D. (1986)

Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322:641-4.

Gomi, S., Zhou, C.E., Yih, W., Majima, K., and Maeda, S. (1997)

Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology* 230:35-47.

Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A., and Tjian, R. (1993)

Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75:519-30.

Granados, R.R., and Williams, K.A. (1986)

In vivo infection and replication of baculoviruses.

In: *The Biology of Baculoviruses: Volume I, Biological Properties and Molecular Biology.* (R.R. Granados and B.A. Fredeci, Eds.) *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, USA, 89-108.

Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R. 3rd, and Workman J.L. (1998)

A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94:45-53.

Gröner, A. (1986)

Specificity and safety of baculoviruses.

In: *The biology of baculoviruses.* (Granados, R.R. and Federici, B.A. ed.). Vol.1, 177-202.

Gruhl, M.A., Buller, P.L., and Weaver, R.F. (1981)

α -Amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 38:916-21.

Guarino, L.A., Gonzales, M.A., and Summers, M.A. (1986)

Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 60:224-9.

Guarino, L.A., and Summers, M.D. (1986 a)

Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* 57:563-71.

Guarino, L.A., and Summers, M.D. (1986 b)

Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression. *J. Virol.* 60: 215-23.

Guarino, L.A. (1990)

Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87:409-13.

Guarino, L.A., Xu, B., Jin, J., and Dong, W. (1998 a)

A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J. Virol.* 72:7985-91.

Guarino, L.A., Jin, J., and Dong, W. (1998 b)

Guanylttransferase activity of the LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase. *J. Virol.* 72:10003-10.

Günther, K. (2005)

Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2005.

Haas, A.L., Katzung, D.J., Reback, P.M., and Guarino, L.A. (1996)

Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*. *Biochemistry* 35:5385-94.

Hagglund, R., Van Sant, C., Lopez, P., and Roizman, B. (2002)

Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:631-6.

Hahn, S. (1998)

Activation and the role of reinitiation in the control of transcription by RNA polymerase II. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63:181-8.

Hammond, R.A., Byrnes, J.J., and Miller, M.R. (1987)

Identification of DNA polymerase delta in CV-1 cells: studies implicating both DNA polymerase delta and DNA polymerase alpha in DNA replication. *Biochemistry* 26:6817-24.

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of *E. coli*.
In: *DNA Cloning*, Volume I, Glover, D.M. (ed.), IRL Press, Oxford, UK.

Hang, X., Dong, W., and Guarino, L.A. (1995)

The lef-3 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encodes a single-stranded DNA-binding protein. *J. Virol.* 69:3924-8.

Hannon, G.J. (2002)

RNA interference. *Nature* 418:244-51.

Harland, L., Crombie, R., Anson, S., deBoer, J., Ioannou, P.A., and Antoniou, M. (2002)

Transcriptional regulation of the human TATA binding protein gene. *Genomics* 79:479-82.

Harlow, E., and Lane, D. (1988)

Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.

Hartley, K.A., and Alexander, K.A. (2002)

Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication. *J. Virol.* 76:5014-23.

Helinek, T.G., Devlin, T.M., and Ch'ih, J.J. (1982)

Initial inhibition and recovery of protein synthesis in cycloheximide-treated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 31:1219-25.

Hernandez, N. (1993)

TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* 7:1291-308.

Hershberger, P.A., LaCount, D.J., and Friesen, P.D. (1994)

The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. *J. Virol.* 68:3467-77.

Hicke, L. (2001)

Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:195-201.

Hink, W.F. (1970)

Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature* 226:466-7.

Hink, W.F. (1980)

The 1979 compilation of invertebrate cell lines and culture media.

In: *Invertebrate systems in vitro* (Kurstak, E., Maramorosch, K. and Dubendorfer, A.), 553-558.

Hink, W.F., and Hall, R.L. (1989)

Recently established invertebrate cell lines.

In: *Invertebrate cell system applications*. Mitsuhashi, J., 269-293.

Hobbs, N.K., Bondareva, A.A., Barnett, S., Capecchi, M.R., and Schmidt, E.E. (2002)

Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental beta2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell* 110:43-54.

Hochstrasser, M. (1996)

Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405-39.

Hodges, M., Tissot, C., and Freemont, P.S. (1998)

Protein regulation: tag wrestling with relatives of ubiquitin. *Curr. Biol.* 8:749-52.

Hoffmann, A., and Roeder, R.G. (1996)

Cloning and characterization of human TAF20/15. Multiple interactions suggest a central role in TFIID complex formation. *J. Biol. Chem.* 271:18194-202.

Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., and Strauss, M. (1995)

Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10099-103.

Hofmann, C., and Strauss, M. (1998)

Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Therapy* 5:531-6.

Hoopes, R.R. Jr., and Rohrmann, G.F. (1991)

In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88:4513-7.

Hu, Y.C. (2005)

Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells.

Acta Pharmacol. Sin. 26:405-16.

Huh, N.E., and Weaver, R.F. (1990)

Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 71:195-201.

Imai, N., Matsuda, N., Tanaka, K., Nakano, A., Matsumoto, S., and Kang, W. (2003)

Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins.

J. Virol. 77:923-30.

Imai, N., Matsumoto, S., and Kang, W. (2005)

Formation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IE2 nuclear foci is regulated by the functional domains for oligomerization and ubiquitin ligase activity. *J. Gen. Virol.* 86:637-44.

Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997)

Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol.* 7:689-92.

Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., Hinton, A.C., Huang, Q., Severson, T.F., Kang, K., and Hammock, B.D. (2001)

Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Manag. Sci.* 57:981-7.

Ito, E., Sahri, D., Knippers, R., and Carstens, E.B. (2004)

Baculovirus proteins IE-1, LEF-3, and P143 interact with DNA in vivo: a formaldehyde cross-linking study. *Virology* 329:337-47.

Jarvis, D.L., Bohlmeier, D.A., and Garcia, A. Jr. (1991)

Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. *Virology* 185:795-810.

Jarvis, D.L., Bohlmeier, D.A., and Garcia, A. Jr. (1992)

Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection. *J. Virol.* 66:6903-11.

Jarvis, D.L., and Garcia, A. Jr. (1994)

Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* 205:300-13.

Jenkins, H.L., and Spencer, C.A. (2001)

RNA polymerase II holoenzyme modifications accompany transcription reprogramming in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 75:9872-84.

Jentsch, S., and Pyrowolakis, G. (2000)

Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* 10:335-42.

Jin, J., Dong, W., and Guarino, L.A. (1998)

The LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase has RNA 5'-Triphosphatase and ATPase activities. *J. Virol.* 72:10011-19.

Johnson, P.A., Miyanohara, A., Levine, F., Cahill, T., and Friedmann, T. (1992)

Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 66:2952-65.

Johnson, S.A., Dubeau, L., Kawalek, M., Dervan, A., Schonthal, A.H., Dang, C.V., and Johnson, D.L. (2003)

Increased expression of TATA-binding protein, the central transcription factor, can contribute to oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23:3043-51.

Joseph, A.M., Kumar, M., and Mitra, D. (2005)

Nef: "necessary and enforcing factor" in HIV infection. *Curr. HIV Res.* 3:87-94.

Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., and Smith, A.E. (1984)

Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311:33-8.

Kalejta, R.F., and Shenk, T. (2003)

Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:3263-8.

Kawasaki, Y., Matsumoto, S., and Nagamine, T. (2004)

Analysis of baculovirus IE1 in living cells: dynamics and spatial relationships to viral structural proteins. *J. Gen. Virol.* 85:3575-83.

Keddie, B.A., Aponte, G.W., and Volkman, L.E. (1989)

The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243:1728-30.

Kent, J.R., Zeng, P.Y., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N.W., and Berger, S.L. (2004)

During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J. Virol.* 78:10178-86.

Kim, J.L., Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1993)

Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365:520-7.

Kim, J.M., Hong, Y., Jeang, K.T., and Kim, S. (2000)

Transactivation activity of the human cytomegalovirus IE2 protein occurs at steps subsequent to TATA box-binding protein recruitment. *J. Gen. Virol.* 81:37-46.

King, L.A., and Possee, R.D. (1992)

The baculovirus expression system: a laboratory guide. Chapman and Hall, London.

Knebel-Mörsdorf, D., Kremer, A., and Jahnel, F. (1993)

Baculovirus gene ME53, which contains a putative zinc finger motif, is one of the major early-transcribed genes. *J. Virol.* 67:753-8.

Knudson, D.L. (1979)

Plaque assay of baculoviruses employing an agarose-nutrient overlay. *Intervirology* 11:40-6.

Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H., and Tsuji, S. (1999)

A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Mol. Genet.* 8:2047-53.

Kokubo, T., Gong, D.W., Wootton, J.C., Horikoshi, M., Roeder, R.G., and Nakatani, Y. (1994)

Molecular cloning of Drosophila TFIID subunits. *Nature* 367:484-7.

Kool, M., Voeten, J.T., Goldbach, R.W., Tramper, J., and Vlak, J.M. (1993)

Identification of seven putative origins of Autographa californica multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *J. Gen. Virol.* 74:2661-8.

Kool, M., Ahrens, C.H., Goldbach, R.W., Rohrmann, G.F., and Vlak, J.M. (1994)

Identification of genes involved in DNA replication of the Autographa californica baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11212-6.

Kost, T.A., Condreay, J.P., and Jarvis, D.L. (2005)

Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23:567-75.

Kovacs, G.R., Guarino, L.A., and Summers, M.D. (1991)

Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus Autographa californica multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 65:5281-8.

Krappa, R., and Knebel-Mörsdorf, D. (1991)

Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *J. Virol.* 65:805-12.

Krappa, R., Roncarati, R., and Knebel-Mörsdorf, D. (1995)

Expression of PE38 and IE2, viral members of the C₃HC₄ finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions. *J. Virol.* 69:5287-93.

Kremer, A., and Knebel-Mörsdorf, D. (1998)

The early baculovirus he65 promoter: On the mechanism of transcriptional activation by IE1. *Virology* 249:336-51.

Kuras, L., and Struhl, K. (1999)

Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399:609-13.

LaCount, D.J., Hanson, S.F., Schneider, C.L., and Friesen, P.D. (2000)

Caspase inhibitor P35 and inhibitor of apoptosis Op-IAP block in vivo proteolytic activation of an effector caspase at different steps. *J. Biol. Chem.* 275:15657-64.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.

Lanford, R.E., Kanda, P., and Kennedy, R.C. (1986)

Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 46:575-82.

Laurent, A.M., Madjar, J.J., and Greco, A. (1998)

Translational control of viral and host protein synthesis during the course of herpes simplex virus type 1 infection: evidence that initiation of translation is the limiting step. *J. Gen. Virol.* 79:2765-75.

- Lavigne, A.C., Mengus, G., May, M., Dubrovskaya, V., Tora, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1996)**
Multiple interactions between hTAFII55 and other TFIID subunits. Requirements for the formation of stable ternary complexes between hTAFII55 and the TATA-binding protein.
J. Biol. Chem. 271:19774-80.
- Lee, W.S., Kao, C.C., Bryant, G.O., Liu, X., and Berk, A.J. (1991)**
Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor.
Cell 67:365-76.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1993)**
A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA.
Cell 72:73-84.
- Lee, T.I., and Young, R.A. (1998)**
Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev.* 12:1398-408.
- Lee, M., and Struhl, K. (2001)**
Multiple functions of the nonconserved N-terminal domain of yeast TATA-binding protein.
Genetics 158:87-93.
- Lee, K.B., Wang, D., Lippard, S.J., and Sharp, P.A. (2002)**
Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99:4239-44.
- Leisy, D.J., and Rohrmann, G.F. (1993)**
Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* 196:722-30.
- Leonard, D.A., and Chen, H.W. (1984)**
Aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha, inhibits conversion of lanosterol to C-27 sterols in mouse L cells. *J. Biol. Chem.* 259:4904-9.
- Leopardi, R., Ward, P.L., Ogle, W.O., and Roizman, B. (1997)**
Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *J. Virol.* 71:1133-9.
- Leresche, A., Wolf, V.J., and Gottesfeld, J.M. (1996)**
Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle.
Exp. Cell Res. 229:282-8.
- Li, Y., Passarelli, A.L., and Miller, L.K. (1993)**
Identification, sequence, and transcriptional mapping of lef-3, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. *J. Virol.* 67:5260-8.
- Li, X.Y., Virbasius, A., Zhu, X., and Green, M. (1999)**
Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* 399:605-9.
- Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L., Martin, S., O'Reilly, N.J., Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., and Freemont, P.S. (1993)**
Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2112-6.
- Lu, A., and Carstens, E.B. (1991)**
Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 181:336-47.
- Lu, A., and Carstens, E.B. (1993)**
Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 195:710-8.

Lu, A., and Miller, L.K. (1994)

Identification of three late expression factor genes within the 33.8- to 43.4-map-unit region of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 68:6710-8.

Lu, A., and Miller, L.K. (1995)

The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J. Virol.* 69:975-82.

Lu, S.Y., Qi, Y.P., and Ge, G.Q. (2002)

Interaction of Heliothis armigera nuclear polyhedrosis viral capsid protein with its host actin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35:562-7.

Luckow, V.A., and Summers, M.D. (1988)

Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio Technology* 6:47-55.

Mainz, D., Quadt, I., and Knebel-Mörsdorf, D. (2002)

Nuclear IE2 structures are related to viral DNA replication sites during baculovirus infection. *J. Virol.* 76:5198-207.

Maldonado, E., and Allende, J.E. (1999)

Phosphorylation of yeast TBP by protein kinase CK2 reduces its specific binding to DNA. *FEBS Lett.* 443:256-60.

Mans, R.M., and Knebel-Mörsdorf, D. (1998)

In vitro transcription of pe38/polyhedrin hybrid promoters reveals sequences essential for recognition by the baculovirus-induced RNA polymerase and for the strength of very late viral promoters. *J. Virol.* 72:2991-8.

Martel, L.S., Brown, H.J., and Berk, A.J. (2002)

Evidence that TAF-TATA box-binding protein interactions are required for activated transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 22:2788-98.

Martianov, I., Viville, S., and Davidson, I. (2002)

RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science* 298:1036-9.

Maul, G.G. (1998)

Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20:660-7.

McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., and Taylor, P. (1988)

The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69:1531-74.

McLachlin, J.R., and Miller, L.K. (1994)

Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J. Virol.* 68:7746-56.

Means, J.C., Muro, I., and Clem, R.J. (2003)

Silencing of the baculovirus Op-iap3 gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of apoptosis during Orgyia pseudotsugata M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. *J. Virol.* 77:4481-8.

Mengus, G., May, M., Jacq, X., Staub, A., Tora, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1995)

Cloning and characterization of hTAFII18, hTAFII20 and hTAFII28: three subunits of the human transcription factor TFIID. *EMBO J.* 14:1520-31.

Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1997)

Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.* 11:1381-95.

- Mikhailov, V.S., Mikhailova, A.L., Iwanaga, M., Gomi, S., and Maeda, S. (1998)**
Bombyx mori nucleopolyhedrovirus encodes a DNA-binding protein capable of destabilizing duplex DNA. *J. Virol.* 72:3107-16.
- Miller, L.K. (1996)**
Insect viruses.
In: Fields Virology, Third Edition, edited by Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, chapter 18, 533-544.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., and Allis, C.D. (1996)**
The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87:1261-70.
- Moreau, P., Hen, R., Wasyluk, B., Everett, R., Gaub, M.P., and Chambon, P. (1981)**
The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Res.* 9:6047-68.
- Morris, T.D., and Miller, L.K. (1994)**
Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. *Gene* 140:147-53.
- Müller, F., Lakatos L., Dantonel J., Strahle U., and Tora, L. (2001)**
TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr. Biol.* 11:282-7.
- Muggeridge, M.I., and Fraser, N.W. (1986)**
Chromosomal organization of the herpes simplex virus genome during acute infection of the mouse central nervous system. *J. Virol.* 59:764-7.
- Munz, C., Psichari, E., Mandilis, D., Lavigne, A.C., Spiliotaki, M., Oehler, T., Davidson, I., Tora, L., Angel, P., and Pintzas, A. (2003)**
TAF7 (TAFII55) plays a role in the transcription activation by c-Jun. *J. Biol. Chem.* 278:21510-6.
- Murges, D., Quadt, I., Schröer, J., and Knebel-Mörsdorf, D. (2001)**
Dynamic nuclear localization of the baculovirus proteins IE2 and PE38 during the infection cycle: The promyelocytic leukemia protein colocalizes with IE2. *Exp. Cell Res.* 264:219-32.
- Nakamura, K., Jeong, S.Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S., and Kanazawa, I. (2001)**
SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* 10:1441-8.
- Nathans, D., and Smith, H.O. (1975)**
Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44:273-93.
- Nicola, A.V., McEvoy, A.M., and Straus, S.E. (2003)**
Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77:5324-32.
- Niederman, T.M., Thielan, B.J., and Ratner, L. (1989)**
Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86:1128-32.
- O'Brien, T., and Tjian, R. (1998)**
Functional analysis of the human TAFII250 N-terminal kinase domain. *Mol. Cell.* 1:905-11.
- Oelgeschlager, T., Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1996)**
Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* 382:735-8.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998)**
Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94:35-44.

- Okano, K., Mikhailov, V.S., and Maeda, S. (1999)**
Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories. *J. Virol.* 73:110-9.
- Ooi, B.G., and Miller, L.K. (1988)**
Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 166:515-23.
- Ooi, B.G., Rankin, C., and Miller, L.K. (1989)**
Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J. Mol. Biol.* 210:721-36.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., and Luckow, V.A. (1992)**
Baculovirus expression vectors - A laboratory manual. W.H. Freeman & Co., New York.
- Partington, S., Yu, H., Lu, A., and Carstens, E.B. (1990)**
Isolation of temperature sensitive mutants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: phenotype characterization of baculovirus mutants defective in very late gene expression. *Virology* 175:91-102.
- Passarelli, A.L., and Miller, L.K. (1993)**
Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. *J. Virol.* 67:2149-58.
- Passarelli, A.L., Todd, J.W., and Miller, L.K. (1994)**
A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. *J. Virol.* 68:4673-8.
- Pearson, M.N., Russel, R.L., Rohrman, G.F., and Beaudreau, G.S. (1988)**
p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology* 167:407-13.
- Pearson, M., Bjornson, R., Pearson, G., and Rohrmann, G. (1992)**
The Autographa californica baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. *Science* 257:1382-4.
- Pemberton, L.F., Rosenblum, J.S., and Blobel, G. (1999)**
Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J. Cell Biol.* 145:1407-17.
- Pereira, L.A., van der Knaap, J.A., van den Boom, V., van den Heuvel, F.A., and Timmers, H.T. (2001)**
TAF(II)170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity. *Mol. Cell Biol.* 21:7523-34.
- Perletti L., Dantonel J.C., and Davidson I. (1999)**
The TATA-binding protein and its associated factors are differentially expressed in adult mouse tissues. *J. Biol. Chem.* 274:15301-4.
- Perletti, L., Kopf, E., Carre, L., and Davidson, I. (2001)**
Coordinate regulation of RARGamma2, TBP, and TAFII135 by targeted proteolysis during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *BMC Mol. Biol.* 2:4.
- Persengiev, S.P., Zhu, X., Dixit, B.L., Maston, G.A., Kittler, E.L., and Green, M.R. (2003)**
TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:14887-91.
- Pham, A.D., and Sauer, F. (2000)**
Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science* 289:2357-60.
- Phelan, A., Dunlop, J., Patel, A.H., Stow, N.D., and Clements, J.B. (1997)**
Nuclear sites of herpes simplex virus type 1 DNA replication and transcription colocalize at early times postinfection and are largely distinct from RNA processing factors. *J. Virol.* 71:1124-32.

Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (1997)

Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. *J. Gen. Virol.* 78:905-9.

Pieles, U., Zurcher, W., Schar, M., and Moser, H.E. (1993)

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 21:3191-6.

Possee, R.D., and Howard, S.C. (1987)

Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 15:10233-48.

Powell, K.L., and Watson, D.H. (1975)

Some structural antigens of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 29:167-78.

Preston, C.M. (1979)

Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK. *J. Virol.* 29:275-84.

Prikhod'ko, E.A., and Miller, L.K. (1998)

Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest. *J. Virol.* 72:684-92.

Prikhod'ko, E.A., Lu, A., Wilson, J.A., and Miller, L.K. (1999)

In vivo and in vitro analysis of baculovirus ie-2 mutants. *J. Virol.* 73:2460-8.

Pugh, B.F., and Tjian, R. (1991)

Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* 5:1935-45.

Pugh, B.F. (2000)

Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255:1-14.

Quadt, I. (2000)

Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2000.

Quadt, I., Mainz, D., Mans, R., Kremer, A., and Knebel-Mörsdorf, D. (2002)

Baculovirus infection raises the level of TATA-binding protein that colocalizes with viral DNA replication sites. *J. Virol.* 76:11123-27.

Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Branton, P.E. (2001)

Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* 15:3104-17.

Rankin, C., Ooi, B.G., and Miller, L.K. (1988)

Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene* 70:39-49.

Rasmussen, C., and Rohrmann, G.F. (1994)

Characterization of the *Spodoptera frugiperda* TATA-binding protein: nucleotide sequence and response to baculovirus infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24:699-708.

Reid, S.J., van Roon-Mom, W.M., Wood, P.C., Rees, M.I., Owen, M.J., Faull, R.L., Dragunow, M., and Snell, R.G. (2004)

TBP, a polyglutamine tract containing protein, accumulates in Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.* 125:120-8.

Reilly, L.M., and Guarino, L.A. (1996)

The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication. *Virology* 218:243-7.

Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., and Schwartz, A. (2000)

Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* 19:5944-50.

Rice, S.A., Long, M.C., Lam, V., and Spencer, C.A. (1994)

RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 68:988-1001.

Rice, S.A., Long, M.C., Lam, V., Schaffer, P.A., and Spencer, C.A. (1995)

Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *J. Virol.* 69:5550-9.

Roeder, R.G. (1996)

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21:327-35.

Rohrmann, G.F. (1986)

Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* 67:1499-513.

Roizman, B., and Sears, A.E. (1996)

Herpes simplex viruses and their replication.

In: Fields Virology, Third Edition, edited by Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2231-95.

Ross, L., and Guarino, L.A. (1997)

Cycloheximide inhibition of delayed early gene expression in baculovirus-infected cells. *Virology* 232:105-13.

Roy, A.L., Malik, S., Meisterernst, M., and Roeder, R.G. (1993)

An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* 365:355-9.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-54.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.

Saitoh, H., Pu, R.T., and Dasso, M. (1997)

SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem. Sci.* 22:374-6.

Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P. (2001)

Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293:1651-3.

Saluja, D., Vassallo, M.F., and Tanese, N. (1998)

Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators. *Mol. Cell. Biol.* 18:5734-43.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-7.

Schang, L.M., Phillips, J., and Schaffer, P.A. (1998)

Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J. Virol.* 72:5626-37.

- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993)**
The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
- Schelhaas, M. (2003)**
Dissertation, Universität zu Köln, 2003.
- Schmidt, E.E., and Schibler U. (1995)**
High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. *Development* 121:2373-83.
- Schmidt, E.E., Bondareva, A.A., Radke, J.R., and Capecchi, M.R. (2003)**
Fundamental cellular processes do not require vertebrate-specific sequences within the TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278:6168-74.
- Schneider, R.J., and Shenk, T. (1987)**
Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:317-32.
- Sheaff, R.J., Singer, J.D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. (2000)**
Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell* 5:403-10.
- Smiley, J.R. (2004)**
Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J. Virol.* 78:1063-8.
- Smith, G.E., Summers, M.D., and Fraser, M.J. (1983)**
Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* 3:2156-65.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985)**
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Smith, C.A., Bates, P., Rivera-Gonzalez, R., Gu, B., and DeLuca, N.A. (1993)**
ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J. Virol.* 67:4676-87.
- Solow, S., Salunek, M., Ryan, R., and Lieberman, P.M. (2001)**
Taf(II) 250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity. *J. Biol. Chem.* 276:15886-92.
- Spear, P.G., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H. (2000)**
Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275:1-8.
- Spencer, C.A., Dahmus, M.E., and Rice, S.A. (1997)**
Repression of host RNA polymerase II transcription by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 71:2031-40.
- Stewart, T.M., Huijskens, I., Willis, L.G., and Theilmann, D.A. (2005)**
The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ie0-ie1 gene complex is essential for wild-type virus replication, but either IE0 or IE1 can support virus growth. *J. Virol.* 79:4619-29.
- Stringer, K.F., Ingles, C.J., and Greenblatt, J. (1990)**
Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345:783-6.
- Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L., and Admon, A. (1996)**
Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:13611-6.

- Tao, Y., Guermah, M., Martinez, E., Oelgeschlager, T., Hasegawa, S., Takada, R., Yamamoto, T., Horikoshi, M., and Roeder, R.G. (1997)**
Specific interactions and potential functions of human TAFII100. *J. Biol. Chem.* 272:6714-21.
- Taylor, T.J., and Knipe, D.M. (2004)**
Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J. Virol.* 78:5856-66.
- Thomas, P.S. (1980)**
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77:5201-5.
- Thomas, D., and Tyers, M. (2000)**
Transcriptional regulation: Kamikaze activators. *Curr. Biol.* 10:R341-3.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000)**
Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94-102.
- Timmers, H.T., and Sharp, P.A. (1991)**
The mammalian TFIID protein is present in two functionally distinct complexes. *Genes Dev.* 5:1946-56.
- Titterington, J.S., Nun, T.K., and Passarelli, A.L. (2003)**
Functional dissection of the baculovirus late expression factor-8 gene: sequence requirements for late gene promoter activation. *J. Gen. Virol.* 84:1817-26.
- Tjia, S.T., Carstens, E.B., and Doerfler, W. (1979)**
Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus – II. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology* 99:399-409.
- Todd, J.W., Passarelli, A.L., Lu, A., and Miller, L.K. (1996)**
Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *J. Virol.* 70:2307-17.
- Tomalski, M.D., Wu, J.G., and Miller, L.K. (1988)**
The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology* 167:591-600.
- Tora, L. (2002)**
A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 16:673-5.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979)**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4.
- Um, M., Yamauchi, J., Kato, S., and Manley, J.L. (2001)**
Heterozygous disruption of the TATA-binding protein gene in DT40 cells causes reduced *cdc25B* phosphatase expression and delayed mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 21:2435-48.
- Vail, P., Sutter, G., Jay, D., and Gough, D. (1971)**
Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.* 17:383-8.
- Valdes, V.J., Sampieri, A., Sepulveda, J., and Vaca, L. (2003)**
Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus. *J. Biol. Chem.* 278:19317-24.
- van der Knaap, J.A., Borst, J.W., van der Vliet, P.C., Gentz, R., and Timmers, H.T. (1997)**
Cloning of the cDNA for the TATA-binding protein-associated factorII170 subunit of transcription factor B-TFIID reveals homology to global transcription regulators in yeast and *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:11827-32.

- van Oers, M.M., Flipsen, J.T., Reusken, C.B., Sliwinsky, E.L., Goldbach, R.W., and Vlak, J.M. (1993)**
Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.
J. Gen. Virol. 74:563-74.
- Varshavsky, A. (1996)**
The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:12142-9.
- Vassallo, M.F., and Tanese, N. (2002)**
Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:5919-24.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tomkins, G.J., and McCawley, P. (1977)**
The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).
In Vitro 13:213-7.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003)**
Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* 4:137-42.
- Verrijzer, C.P., Chen, J.L., Yokomori, K., and Tjian, R. (1995)**
Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* 81:1115-25.
- Verrijzer, C.P., and Tjian, R. (1996)**
TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* 21:338-42.
- Vier, J., Furmann, C., and Hacker G. (2000)**
Baculovirus P35 protein does not inhibit caspase-9 in a cell-free system of apoptosis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 276:855-61.
- Volkman, L.E. (1986)**
The 64K envelope protein of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 131:103-18.
- Volkman, L.E., and Keddie, B.A. (1990)**
Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology* 1:249-256.
- Voß, D. (2003)**
Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2003.
- Walker, A.K., and Blackwell, T.K. (2003)**
A broad but restricted requirement for TAF-5 (human TAFII100) for embryonic transcription in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 278:6181-6.
- Wang, H.D., Yuh, C.H., Dang, C.V., and Johnson, D.L. (1995)**
The hepatitis B virus X protein increases the cellular level of TATA-binding protein, which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol. Cell. Biol.* 15:6720-8.
- Wang, H.D., Trivedi, A., and Johnson, D.L. (1997)**
Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17:6838-46.
- Wassarman, D.A., and Sauer, F. (2001)**
TAF(II)250: a transcription toolbox. *J. Cell. Sci.* 114:2895-902.
- Weaver, R.F. (2002)**
Transcription in Eukaryotes (part IV). In: *Molecular Biology*, 2nd Edition, McGraw-Hill.
- Weissman, J.D., Brown, J.A., Howcroft, T.K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P.A., Schiltz, L., Nakatani, Y., and Singer, D.S. (1998)**
HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:11601-6.

- Werten, S., Mitschler, A., Romier, C., Gangloff, Y.G., Thuault, S., Davidson, I., and Moras, D. (2002)**
Crystal structure of a subcomplex of human transcription factor TFIID formed by TATA binding protein-associated factors hTAF4 (hTAF(II)135) and hTAF12 (hTAF(II)20).
J. Biol. Chem. 277:45502-9.
- Weyer, U., and Possee, R.D. (1988)**
Functional analysis of the p10 gene 5' leader sequence of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 16:3635-53.
- Weyer, U., and Possee, R.D. (1989)**
Analysis of the promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene.
J. Gen. Virol. 70:203-8.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D. (1988)**
Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175:231-7.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998)**
Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II.
Nature 393:187-91.
- Wilkinson, D.E., and Weller, S.K. (2003)**
The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life.* 55:451-8.
- Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J., and Faulkner, P. (1989)**
A cytopathological investigation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J. Gen. Virol.* 70:187-202.
- Wood, H.A. (1977)**
An agar overlay plaque assay method for Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.
J. Invert. Pathol. 29:304-7.
- Wood, H.A. (1980)**
Autographa californica nuclear polyhedrosis virus-induced proteins in tissue culture.
Virology 102:21-7.
- Xie, X., Kokubo, T., Cohen, S.L., Mirza, U.A., Hoffmann, A., Chait, B.T., Roeder, R.G., Nakatani, Y., and Burley, S.K. (1996)**
Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer.
Nature 380:316-22.
- Yang, C.L., Stetler, D.A., and Weaver, R.F. (1991)**
Structural comparison of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*.
Virus Res. 20:251-64.
- Yang, S., and Miller, L.K. (1999)**
Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J. Virol.* 73:3404-9.
- Yip, T.T., and Hutchens, T.W. (1992)**
Mapping and sequence-specific identification of phosphopeptides in unfractionated protein digest mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.
FEBS Lett. 308:149-53.
- Yoo, S., and Guarino, L.A. (1994 a)**
Functional dissection of the ie2 gene product of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202:164-72.
- Yoo, S., and Guarino, L.A. (1994 b)**
The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator.
Virology 202:746-53.

Yuan, H., Puckett, S., and Lyles, D.S. (2001)

Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J. Virol.* 75:4453-8.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000)

A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408:225-9.

Zawel, L., Kumar, K.P., and Reinberg, D. (1995)

Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9:1479-90.

Zhong, L., and Hayward, G.S. (1997)

Assembly of complete, functionally active herpes simplex virus DNA replication compartments and recruitment of associated viral and cellular proteins in transient cotransfection assays. *J. Virol.* 71:3146-60.

Zuhlke, C., Hellenbroich, Y., Dalski, A., Kononowa, N., Hagenah, J., Vieregge, P., Riess, O., Klein, C., and Schwinger, E. (2001)

Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. *Eur. J. Hum. Genet.* 9:160-4.

VIII. Kurzzusammenfassung

Das zentrale Interesse dieser Studien bestand darin, den Einfluss der Infektion großer DNA-Viren auf den basalen Transkriptionsapparat der Wirtszellen zu untersuchen. Die frühe Genexpression des Baculovirus AcMNPV erfolgt durch die zelluläre RNAP II. Die späten und die hyperexprimierten sehr späten viralen Gene werden hingegen durch eine viruskodierte RNA-Polymerase transkribiert. Es wird angenommen, dass der basale zelluläre Transkriptionsfaktor TBP in der frühen baculoviralen Transkription involviert ist, wohingegen eine Beteiligung von TBP an der späten Infektion unbekannt ist.

Expressionsanalysen zeigten einen signifikanten Anstieg der TBP-Proteinmenge in der späten AcMNPV-Infektionsphase, der im Gegensatz zur beschriebenen virusinduzierten Abnahme der zellulären Genexpression stand. Somit ergab sich die Frage, wie der TBP-Anstieg durch das Virus induziert wird, und welche Bedeutung er für die Infektion hat. Nach Hemmung der Translation konnte eine hohe Stabilität von TBP nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu steht ein plötzlicher Abfall der gestiegenen TBP-Menge in infizierten TN-368-Zellen, so dass ein aktiver virusinduzierter Abbaumechanismus von TBP möglich ist. In Lokalisierungsstudien konnte kein direkter Zusammenhang dieses TBP-Abbaus mit dem Ubiquitin-Proteasomen-Weg hergestellt werden. In der ebenfalls permissiven Zelllinie Sf21 wurde der Abfall der TBP-Proteinmenge nicht beobachtet.

Lokalisierungsstudien zeigten eine TBP-Relokalisierung von einem granulären Färbemuster im gesamten Zellkern in distinkte Kerndomänen ab der frühen Infektionsphase. Diese Kernstrukturen kolokalisierten mit viralen Replikationszentren und nahmen simultan und in Abhängigkeit von den Orten der viralen DNA-Synthese an Größe zu.

In RNA-Interferenzstudien zur Analyse der Bedeutung der Baculovirus-induzierten TBP-Zunahme konnte die TBP-Proteinmenge nur in uninfizierten Zellen reduziert werden, nicht aber in der späten Infektionsphase. Die vergleichsweise durchgeführten Reduktionen der viralen Transkriptions- und Replikationsfaktoren IE2, DBP und LEF-4 zeigten keine Wirkungen auf die Expression der frühen viralen Proteine und von TBP. Nach der Blockierung von DBP konnte in der späten Phase der Infektion eine signifikante Erhöhung der Proteinmengen von viralen LEF-Proteinen beobachtet werden, die jedoch keinen messbaren Effekt auf die Synthese viraler Strukturproteine oder auf die Bildung von Virus-Polyedern hatte. Die Hemmung der postulierten RNA-Polymerase-Untereinheit LEF-4 führte zum Verlust der späten und sehr späten viralen Strukturproteinsynthese und der Virusproduktion.

Vergleichsanalysen während der HSV-1-Infektion, in der ausschließlich die Wirts-RNAP II für die virale Transkription genutzt wird, zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TFIID-Komponenten. In Lokalisierungsstudien konnten die RNAP II und die TFIID-Untereinheiten TBP, TAF1 und TAF4 ab der frühen Phase der Infektion in distinkten Kerndomänen beobachtet werden, die mit Orten der viralen DNA-Synthese kolokalisierten. Die initiale Relokalisierung der basalen Transkriptionsfaktoren in Präreplikationszentren schien unabhängig von replizierender viraler DNA stattzufinden, wohingegen die Größenzunahme der Kernstrukturen in Abhängigkeit von viralen DNA-Replikationszentren geschah. Diese Daten zeigen erstmals eine Zunahme des TBP-Proteins in der späten Baculovirus-Infektionsphase und deuten damit auf eine Beteiligung von TBP an der Hyperexpression der sehr späten viralen Faktoren hin. In einem offenbar konservierten Mechanismus im Infektionsverlauf großer DNA-Viren findet die virale Transkription an Orten der viralen DNA-Synthese durch Rekrutierung von TFIID-Untereinheiten statt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die freigesetzten Virusgenome direkt für die Transkription zugänglich sind, so dass basale Transkriptionsfaktoren in Replikationszentren rekrutiert werden.

IX. Abstract

This study aims to understand the influence of large DNA viruses on the basal transcriptional machinery of the host cell. The gene expression cascade of the baculovirus AcMNPV is temporally regulated. Host RNAP II recognizes early viral promoters, whereas late genes and the hyperexpressed very late genes are transcribed by a virus-encoded RNA polymerase. Little is known about the involvement of host cell factors in late transcription.

In contrast to the general shut down of host protein synthesis during infection, a significant increase of the TBP protein was observed during the late and very late phases of AcMNPV infection. Inhibitor studies revealed a high stability of TBP in uninfected cells. Thus the reduction of initially increased TBP in TN-368 cells postulates an active degradation of TBP during infection. A direct correlation of decreasing TBP and the ubiquitin-proteasome pathway was not detectable.

In indirect immunofluorescence studies relocation of TBP was observed in the early phase of infection. TBP localized to distinct nuclear compartments which colocalized with viral DNA replication sites. As soon as viral DNA replication was visible in distinct nuclear sites, colocalization with TBP was observed. TBP redistribution was shown to be dependent on viral DNA synthesis.

RNA interference studies were carried out for analysing the baculovirus-induced TBP protein level increase. TBP could only be reduced in uninfected cells, but not during the late phase of infection. In comparison, viral transcription and replication factors IE2, DBP and LEF-4 could be silenced which revealed no influence on the expression of early viral genes or TBP. Inhibition of DBP led to a significant increase of viral LEF protein levels during the late phase of infection. However, this did not result in a measurable effect on the synthesis of structural virus proteins or formation of viral polyhedra. Inhibition of the virus-encoded RNA polymerase component LEF-4 resulted in a loss of expression of late and very late viral structural proteins and the formation of viral progeny.

The HSV-1 genome is transcribed by host RNAP II throughout early and late phases of infection. When expression of TBP and a set of different TAFs was analyzed during HSV-1 infection no significant effect on the protein levels of TFIID components was found. RNAP II and the TFIID subunits TBP, TAF1 and TAF4 were relocated to distinct nuclear structures in the early phase of infection. Initial redistribution of TBP and TAFs to prereplicative sites appears to be independent on early viral replication; further accumulation of the TFIID

components, however, correlates with formation and enlargement of viral DNA replication compartments.

Taken together these results provide first evidence for an increase of the TBP protein level during the late phase of baculovirus infection and postulate that TBP is involved in the hyperexpression of very late viral factors. Viral transcription takes place at sites of viral DNA synthesis by recruiting TFIID subunits which represents a conserved mechanism during the infection cycle of large DNA viruses. This finding suggests that incoming viral genomes are directly accessible for transcription so that basal transcription factors are recruited in viral DNA replication compartments.

X. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung - abgesehen von den unten genannten zur Veröffentlichung eingereichten Teilpublikationen - vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgenden Titeln publiziert oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Quadt, I., Mainz, D., Mans, R., Kremer, A., and Knebel-Mörsdorf, D. (2002)

Baculovirus infection raises the level of TATA-binding protein that colocalizes with viral DNA replication sites.

J. Virol. 76:11123-27.

Mainz, D., Quadt, I., and Knebel-Mörsdorf, D. (2002)

Nuclear IE2 structures are related to viral DNA replication sites during baculovirus infection.

J. Virol. 76:5198-207.

Quadt, I., Günther, A.K., Voß, D., Schelhaas, M., and Knebel-Mörsdorf, D. (2005)

TATA-binding protein and TBP-associated factors during herpes simplex virus type 1 infection: Localization at viral DNA replication sites.

Virus Res. in press.

Knebel-Mörsdorf, D., Quadt, I., Li, L., Montier, L., and Guarino, L.A.

Expression of baculovirus late/very late genes depends on LEF-4, a component of the viral RNA polymerase whose guanyltransferase function is essential.

(zur Veröffentlichung eingereicht)

Köln, den

Ilja Quadt

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ilja Dimitrij Quadt

Geburtsdatum: 23.10.1973

Geburtsort: Köln

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulischer Werdegang:

1980 - 1984: Gemeinschaftsgrundschule Leuchterstraße in Köln-Dünnwald

1984 - 1993: Rhein-Gymnasium in Köln-Mülheim mit Abschluß Abitur

Studium und Beruf:

1.7.`93 - 30.9.`94: Zivildienst an der Peter-Petersen-Schule, Köln-Höhenhaus

ab Okt. 1994: Studium der Biologie an der Universität zu Köln

Januar 1999 -
Januar 2000: Diplomarbeit im MPI für neurologische Forschung in Köln, mit dem Thema „Untersuchungen zur Lokalisierung früher baculoviraler Proteine in funktionellen Domänen im Zellkern“

28.1.2000: Abschluss des Studiums: Diplom-Biologe

Juni - Okt. 2000: Wissenschaftlicher Mitarbeiter im MPI für neurologische Forschung in Köln

Nov. 2000 -
April 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Molekulare Virologie der GSF in München-Neuherberg

ab Mai 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter im MPI für neurologische Forschung in Köln mit Förderung durch die „Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.“,
Arbeitsgruppe: Professor Dr. D. Knebel-Mörsdorf

XII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihre vielseitige Unterstützung bei der Ermöglichung das Projekt auch nach externem Erfahrungsgewinn fortzuführen, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge jeglicher Art trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Professor Dr. Jens Brüning möchte ich für die Übernahme des Koreferates herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich bei Irmgard Hölker für die Durchführung der Northern Blot-Analysen, sowie bei Professor Dr. Matthias Dobbstein für die Möglichkeit als Gast Ribonuklease-Schutzexperimente in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Dr. Udo Roth danke ich für die Beratungen und für die Analysen der 2-D-Gelelektrophoresen und MALDI-TOF-Studien.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Ute Schepers für die Hilfestellung bei den Insektenzell-Transfektionen.

Bei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Sie trugen sowohl fachlich als auch menschlich zum Gelingen dieser Arbeit bei: Daniel Voß, Timo Liebig, Sven Hoppe, Katharina Günther, Verena Jaeger und Philipp Petermann. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Mario Schelhaas für das Bereitstellen von HSV-1-Inokula und für die Ratschläge und Hilfestellungen bei der konfokalen Mikroskopie.

Mein besonderer Dank gebührt meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung vor und während dieser Doktorarbeit, speziell auch zu Zeiten des Pendlerdaseins.

Meiner Lebensgefährtin Sibille Humme bin ich überaus dankbar für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die fachlichen Diskussionen, das moralische Antreiben, für wertvolle Ablenkungen, umfangreiche kulinarische Verpflegungen und die vielen weiteren Unterstützungen.